

ALINE SERRA TORRICELLI

RECEPTORES SEROTONÉRGICOS 2A/2C DO SEPTO DORSO LATERAL E  
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE DEFESA

SANTOS

2011

Aline Serra Torricelli

RECEPTORES SEROTONÉRGICOS 2A/2C DO SEPTO DORSO LATERAL E  
RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS DE DEFESA

Trabalho de Conclusão de Curso  
desenvolvido para obtenção do grau  
de psicólogo apresentado à  
Universidade Federal de São Paulo –  
Campus Baixada Santista, sob  
orientação da Professora Doutora  
Milena de Barros Viana.

Santos

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

TORRICELLI, Aline S.

Receptores Serotonérgicos 2A/2C do Septo Dorso Lateral e Respostas Comportamentais de Defesa / Aline Serra Torricelli. – Santos, 2011.  
53 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – Campus  
Baixada Santista, 2011.

Curso: Psicologia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milena de Barros Viana

1. Septo Dorso Lateral. 2. Receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>. 3. Ansiedade. 4. Pânico.  
5. Labirinto em T Elevado. I. Orientador (VIANA, Milena B.) II. Receptores  
Serotonérgicos 2A/2C do Septo Dorso Lateral e Respostas Comportamentais de  
Defesa. III. Unifesp – Campus Baixada Santista.

CDD150

Aprovado em 06 de Dezembro de 2011.

Banca Examinadora

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura:

### **Dedicatória**

Dedico esse trabalho ao meu avô Pedro – filho, irmão, esposo, pai, tio, avô e bisavô.

Sempre me ensinou muitas coisas através de suas histórias, de suas vivências e, principalmente, de seus olhares.

## **Agradecimentos**

- À minha família por dar apoio e incentivo às minhas escolhas e ser sempre o meu “porto seguro”;
- À Profa. Dra. Milena de Barros Viana por ter me orientado na graduação e me dado a oportunidade de conhecer melhor o mundo da pesquisa, abrindo portas e possibilidades;
- À Danúbia Cristina de Paula, Marina Lopreato e Juliana Nascimento pelas importantes participações neste projeto;
- Ao José Simões, que além de estar sempre disposto a ajudar, deixava o ambiente descontraído e alegre, com o seu bom humor;
- Às minhas amigas, que foram e sempre serão a minha família. Hoje percebo na pele que família vai muito além dos laços de sangue.

### **Epígrafe**

“O que se leva desta vida é a vida que a gente leva.”

(Aparício Torelly - Barão de Itararé)

## RESUMO

Nos últimos anos, diversas estruturas do sistema nervoso central (SNC) têm sido relacionadas à modulação da ansiedade. Dentre as mais investigadas, destacam-se o sistema septo-hipocampal (SH), a amígdala (AM), o hipotálamo medial (HM), o núcleo dorsal da rafe (NDR) e a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD). O envolvimento de diferentes sistemas neuroquímicos na gênese de respostas comportamentais e fisiológicas a estímulos aversivos também tem sido investigado. Neste sentido, a participação da serotonina (5-HT) tem sido ressaltada pela eficácia de drogas serotoninérgicas no tratamento clínico de alguns subtipos de ansiedade, como o transtorno do pânico (TP) e o transtorno da ansiedade generalizada (TAG). Numa tentativa de melhor elucidar o papel desempenhado pela 5-HT sobre a ansiedade, Deakin e Graeff (1991) propuseram que esta monoamina exerceria um papel modulatório oposto sobre respostas comportamentais de defesa inatas ou aprendidas. Para verificar esta hipótese, um modelo animal de ansiedade, o modelo do labirinto em T elevado (LTE), foi desenvolvido (Graeff et al, 1993; Viana et al, 1994) . O modelo gera em um mesmo rato dois tipos de respostas comportamentais de defesa: uma relacionada à inibição comportamental (a esquivas inibitórias dos braços abertos do labirinto em T) e uma relacionada à emissão (a fuga), respectivamente associadas, em termos clínicos, ao TAG e ao TP. Até o presente momento, existem poucos estudos direcionados à avaliação da função exercida pela área septal lateral neste modelo. Assim, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade à investigação da ação desempenhada pela 5-HT sobre a ansiedade, salientando, entretanto, a mediação realizada pela área septo dorso lateral sobre o comportamento de ratos submetidos ao LTE. Para tanto ratos Wistar machos foram administrados unilateralmente intra-septo dorsolateral com o agonista serotoninérgico 2A DOI (8 e 16 nmoles), com o agonista



seletivo 2C MK-212 (0,1 e 1 nmoles) e com o antagonista serotoninérgico 2A quetanserina (10 e 20 nmoles) e dez minutos depois foram testados no modelo. Todos os animais foram expostos a um campo aberto para avaliação da sua atividade locomotora. Os resultados mostraram que o DOI aumentou a latência de esquiva inibitória, um efeito ansiogênico. O MK e a quetanserina foram desprovidos de efeito, embora a quetanserina tenha antagonizado os efeitos ansiogênicos observados com o DOI. Além disso, nenhuma das drogas administradas apresentou alteração da resposta de fuga dos braços abertos do LTE. Esses resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos 2A do septo dorso lateral estão envolvidos na modulação de uma resposta comportamental de defesa, a esquiva inibitória, e que alterações neste mecanismo neurobiológico podem ser importantes para a fisiopatologia do TAG.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AM – Amígdala

BZD - Benzodiazepínicos

HM – Hipotálamo Medial

IP – Intraperitoneal

LCE - Labirinto em cruz elevado

LTE – Labirinto em T elevado

NRD – Núcleo dorsal da rafe

NS – Não significativo

SCA - Sistema cerebral aversivo

SCPD – Substância cinzenta periaquedutal dorsal

SH – Septo-hipocampo

SIC - Sistema de Inibição Comportamental

SNC – Sistema Nervoso Central

TAG – Transtorno de ansiedade generalizada

TP – Transtorno do pânico

5-HT – Serotonina

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Níveis de defesa, substrato neural, emoção relacionada.....	14
Figura 1	Labirinto em T elevado para análise de duas respostas comportamentais de defesa: esquiva inibitória e a fuga.....	23
Figura 2	Modelo do campo aberto para medida da atividade locomotora.....	23
Figura 3	Sítios de microinjeção intra-septo dorso lateral para os animais tratados com DOI, MK-212, Quetanserina, veículo ou salina.....	29
Tabela 2	Atividade locomotora medida no campo aberto, após injeção das drogas.....	30
Figura 4	Efeito do DOI e do MK-212 intra-septo dorso lateral sobre as medidas de esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do LTE.....	32
Figura 5	Efeito da quetanserina intra-septo dorso lateral sobre as medidas de esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do LTE.....	34
Figura 6	Efeitos da injeção intra-septo dorso lateral da quetanserina ou DOI sobre as medidas de esquiva inibitória e fuga dos braços abertos do LTE.....	36

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E NEUROANATÔMICOS DA ANSIEDADE.....	13
1.2. O PAPEL DUAL DA SEROTONINA NA ANSIEDADE E O LABIRINTO EM T ELEVADO.....	15
1.3. A ÀREA SEPTAL E A ANSIEDADE.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. ANIMAIS.....	22
3.2. DROGAS.....	22
3.3. APARELHOS EXPERIMENTAIS.....	22
3.4. PROCEDIMENTOS.....	24
3.5. PERFUSÃO.....	27
3.6. HISTOLOGIA.....	27
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4. RESULTADOS.....	29

4.1. DOI E MK-212.....	30
4.2. QUETANSERINA.....	32
4.3. ANTAGONISMO DO DOI PELA QUETANSERINA.....	34
5. DISCUSSÃO.....	37
6. BIBLIOGRAFIA.....	42
7. ANEXO I – Artigo Publicado.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E NEUROANATÔMICOS DA ANSIEDADE

Medo e ansiedade são estados emocionais com alto valor adaptativo, manifestados em situações que representam ameaça à integridade física do organismo ou à sua sobrevivência. Para lidarem com os perigos a que são expostos, os animais emitem respostas defensivas desencadeadas pelo temor vivenciado em situações de perigo. O medo e a ansiedade podem ser encarados, portanto, como adaptativos, uma vez que existe uma relação direta entre seu nível de expressão e a eficiência no desempenho em determinada tarefa (Graeff e Guimarães, 2000). Contudo, a partir de certo ponto, observa-se o comprometimento do comportamento devido a níveis muito elevados de ansiedade, o que assinala um prejuízo funcional nas atividades cotidianas. Neste caso, a ansiedade é caracterizada como psicopatologia e, dentro de uma perspectiva biológica, suas raízes funcionais encontram uma analogia nas reações de defesa que os animais exibem frente a estímulos ou situações ameaçadoras (Graeff, 1990). Essa visão justifica o uso de modelos animais em estudos experimentais, considerando-se que as propriedades do cérebro permanecem conservadas ao longo da escala evolutiva.

Em 1988, os pesquisadores Robert e Caroline Blanchard instituíram o conceito de níveis de defesa através da análise eto-experimental do comportamento de ratos. Sob esta perspectiva, a ansiedade estabelecer-se-ia em diversos níveis de perigo, possuindo características distintas em cada um deles, dependendo do contexto em que o animal se encontra. Sendo assim, diferentes substratos neuroanatômicos estariam envolvidos no gerenciamento das reações observadas em cada estágio. A tabela 1 faz referência às 3 estratégias básicas de defesa apresentadas pelos animais frente a situações de perigo, enumerando diversas estruturas do sistema nervoso central (SNC) que têm sido relacionadas aos comportamentos defensivos. Em primeiro lugar, destacam-se o sistema septo-hipocampal

(SH) e a amígdala (AM), os quais serviriam de interface entre o neocórtex e o sistema límbico subcortical. Tanto o SH quanto a AM recebem densas projeções do córtex temporal polimodal, onde se verifica a síntese das informações colhidas pelos diferentes sistemas sensoriais, bem como informações sensoriais de natureza olfativa e interoceptiva. Outras evidências indicam, no entanto, que estas áreas cerebrais não seriam as únicas envolvidas na geração da ansiedade. Assim, tem sido demonstrado que um conjunto de estruturas cerebrais longitudinalmente organizado, compreendendo além de partes da AM, a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) e o hipotálamo medial (HM) e interligado por vias nervosas ascendentes e descendentes, também se constitui em substrato neural da ansiedade. Este circuito, designado de sistema cerebral aversivo (SCA) (Graeff, 1990), coordenaria diferentes estratégias de defesa, como a imobilidade tensa ou congelamento e os comportamentos de luta e de fuga. A ativação destas regiões também evoca sensações extremamente desagradáveis (medo intenso, dor não localizada) no homem (Graeff, 1990).

**Tabela 1 – Níveis de defesa, substrato neural, emoção relacionada.**

Perigo	Reação de defesa	Estruturas cerebrais	Emoção
Potencial	Avaliação de risco/ Inibição comportamental	Septo-hipocampo/ Amígdala	Ansiedade
Antecipado	Congelamento	Amígdala/ Periaquedutal ventral	Ansiedade antecipatória
Distal	Esquiva	Amígdala	Ansiedade condicionada
	Fuga	Hipotálamo medial	Ansiedade incondicionada
Proximal	Fuga/Congelamento	Periaquedutal dorsal	Pânico

Adaptada de Graeff e Guimarães, 2000.

## 1.2. O PAPEL DUAL DA SEROTONINA NA ANSIEDADE E O LABIRINTO EM T ELEVADO

Além da ênfase no aspecto neuroanatômico, ultimamente um grande número de trabalhos tem dedicado especial atenção ao estudo dos sistemas neuroquímicos, os quais se acredita estarem envolvidos na gênese de respostas comportamentais e fisiológicas a estímulos aversivos. Neste sentido, a participação da serotonina (5-HT) tem sido ressaltada pela comprovada eficácia de drogas serotoninérgicas no tratamento clínico de alguns transtornos de ansiedade. Todavia, até alguns anos atrás, o papel desempenhado por esse neurotransmissor não estava muito claro, uma vez que, em alguns estudos pré-clínicos, a 5-HT apresentava papel ansiogênico (Stein et al, 1973), enquanto outros apontavam para um papel ansiolítico dessa monoamina (Kiser et al, 1975).

Numa tentativa de solucionar esta aparente contradição, Deakin e Graeff (1991) propuseram uma teoria argumentando que a 5-HT exerceria um papel modulatório oposto sobre as respostas comportamentais de defesa inatas e aprendidas. Essa teoria enfatiza diferenças anatômicas e funcionais das vias serotoninérgicas, assim como dos diversos subtipos de receptores serotoninérgicos possivelmente envolvidos na funcionalidade destas vias. Dentro desta perspectiva, os autores enfocam também o papel da 5-HT na AM e na SCPD.

Em poucas palavras, a teoria propõe que a via serotoninérgica prosencefálica, originária do núcleo dorsal da rafe (NDR), e que inerva a AM, promoveria comportamentos de esquiva em resposta a estímulos aversivos agudos condicionados, sendo que o tipo de ansiedade elaborada por esta via seria o da ansiedade condicionada, ou seja, antecipatória do perigo. Neste caso, a ameaça estaria a certa distância do animal, levando este a evitá-la. Em termos psicopatológicos, esta via estaria relacionada à ansiedade antecipatória generalizada. Por outro lado, a via serotoninérgica periventricular, originária no NDR e que se projeta para a SCPD estaria relacionada a uma ansiedade do tipo incondicionada, e, em termos clínicos, ao



transtorno do pânico (TP). O sistema serotoninérgico NDR-SCPD também seria ativado em situações de perigo. No entanto, sua função seria inibir a ação desordenada ou pânico, somente adequada quando o animal já foi diretamente atingido, ou seja, encontra-se na situação de perigo iminente. Esta inibição levaria o animal a desempenhar um comportamento eficiente diante do perigo. Isso explicaria a eficácia dos antidepressivos nestes transtornos de ansiedade, uma vez que estes medicamentos atuam restaurando o mecanismo serotoninérgico inibitório na SCPD.

Com o intuito de verificar a hipótese do papel dual da 5-HT sobre a ansiedade, foi desenvolvido o modelo animal denominado labirinto em T elevado (LTE) (Graeff et al, 1993; Viana et al, 1994). Tal modelo, derivado do labirinto em cruz elevado (LCE) (Pellow e File, 1985), é composto por dois braços abertos dispostos perpendicularmente a um fechado, gerando em um mesmo rato, dois tipos de respostas comportamentais de defesa: uma resposta condicionada - a esquiva inibitória - e outra incondicionada - a fuga de uma via - as quais estariam respectivamente relacionadas, em termos clínicos a dois transtornos de ansiedade distintos: o transtorno da ansiedade generalizada (TAG) e o transtorno do pânico (TP). Estudos de validação farmacológica do modelo com três classes de ansiolíticos - o agonista de receptores benzodiazepínicos (BZD) diazepam, o agonista 5-HT<sub>1A</sub> buspirona, e o antagonista não-seletivo de receptores 5-HT<sub>2</sub> ritanserina - demonstraram que estas drogas prejudicam a esquiva inibitória, sem alterarem as medidas de fuga do braço aberto do LTE (Graeff et al, 1998). Como os BZDs e a buspirona são utilizados na clínica preferencialmente para o tratamento do TAG e o TP é refratário ao tratamento com estes mesmos compostos, a esquiva inibitória dos braços abertos do LTE tem sido correlacionada ao TAG e a fuga ao TP (Graeff et al, 1993; Viana et al, 1994). Evidências recentes parecem confirmar esta última hipótese, demonstrando que a administração crônica em ratos de compostos utilizados com eficácia na

clínica para o tratamento do TP, como a imipramina (Teixeira et al, 2000) e a fluoxetina (Poltronieri et al, 2003), apresenta efeito ansiolítico sobre a medida de fuga do braço aberto do modelo em estudo.

### 1.3. A ÁREA SEPTAL E A ANSIEDADE

A área septal é uma região do sistema límbico que tem sido relacionada a processos de aprendizagem e memória, bem como a outros comportamentos emocionais emitidos por vertebrados. É aparentemente através do septo que o hipocampo se comunica com estruturas do tronco encefálico (Thomas et al, 1991). Anatomicamente, a área septal pode ser dividida em duas partes: o septo lateral, que inclui os núcleos dorsal, intermedial e ventral; e o septo medial (Raisman, 1966). Do hipocampo, partem fibras em direção ao septo lateral, que envia projeções ao septo medial que, por sua vez, envia fibras de volta ao hipocampo, fechando o circuito (Swanson e Cowan, 1979). A área septal parece estar, portanto, em uma posição estratégica para mediar estados afetivos, sendo que uma das funções do septo, e em especial do septo lateral, parece ser a mediação de estados aversivos que acompanham o medo e a ansiedade (Menard e Treit, 1996).

Já em 1982, Jeffrey Gray demonstrou um alto grau de correspondência entre a lesão da área septal e o efeito de drogas ansiolíticas. Baseado nesses resultados, Gray propôs um modelo teórico, denominado Sistema de Inibição Comportamental (SIC), para explicar o mecanismo de modulação da ansiedade. As estruturas neuroanatômicas que supostamente constituiriam o SIC seriam o SH, assim como suas interconexões, fibras e vias. No entanto, o real papel da área septal sobre a mediação da ansiedade é ainda hoje controverso.

Em 1993, Yadin e colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de observar os efeitos da lesão e da estimulação elétrica do septo lateral em ratos, sobre o comportamento

dos animais no teste do beber punido. A estimulação da área septal lateral demonstrou efeito ansiolítico, aumentando o número de pressões à barra para obtenção de água, enquanto que as lesões demonstraram um caráter ansiogênico, ou seja, uma diminuição do número de pressões à barra. Baseados nesses achados, os autores propuseram que o septo lateral exerceria um papel inibitório sobre a ansiedade.

Alguns anos mais tarde, porém, Menard e Treit (1996) verificaram os efeitos da lesão da área septal lateral sobre o comportamento de ratos submetidos aos modelos do LCE (Pellow e File, 1985) e do ocultamento defensivo (Treit et al, 1994). Os resultados obtidos por esses pesquisadores mostraram que as lesões provocaram um efeito ansiolítico em ambos os modelos, aumentando o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE e diminuindo a quantidade de serragem depositada sobre o bastão eletrificado no modelo do ocultamento defensivo. Assim, em oposição ao que Yadin e colaboradores (1993) sugeriram, Menard e Treit propuseram que o septo lateral deveria exercer um papel ansiogênico sobre a modulação da ansiedade.

Com relação à neurotransmissão serotoninérgica intra-septo lateral, há alguns anos, Cheeta e colaboradores (2000) verificaram os efeitos da microinjeção na estrutura do agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT sobre o comportamento de ratos submetidos ao teste da interação social (File e Hyde, 1978) e ao LCE (Pellow et al., 1985). Estes resultados demonstraram efeitos ansiogênicos desta droga tanto na primeira exposição dos animais ao LCE quanto no teste da interação social. Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais microinjetados com 8-OH-DPAT e o grupo controle em uma segunda exposição dos animais ao LCE. É interessante que seja salientado que esta segunda exposição ao modelo tem sido relacionada ao medo fóbico (File et al, 1993).

Mais recentemente, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (Viana et al, 2008) com o LTE mostrou que a administração bilateral intra-septo lateral de 8-OH-DPAT facilitou as respostas de esquiva inibitória dos braços abertos do LTE (efeito ansiogênico), sem alterar as respostas de fuga. Além disso, a administração bilateral intra-septo lateral do antagonista de receptores do tipo 1A, WAY-100635, foi capaz de bloquear os efeitos ansiogênicos previamente induzidos pelo 8-OH-DPAT na tarefa de esquiva inibitória. Estes resultados, em conjunto, reforçam a implicação dos receptores 5-HT do tipo 1A, da área septal lateral, na modulação de uma resposta comportamental de defesa específica, clinicamente relacionada ao TAG: a esquiva inibitória dos braços abertos do LTE.

## 2. OBJETIVOS

Atualmente, diversas regiões do SNC têm sido relacionadas à regulação da ansiedade, dentre as quais se destacam o SH, a AM, o HM e a SCPD (ver tabela 1). A investigação do papel realizado por estas estruturas em diferentes respostas comportamentais de defesa vem sendo realizada em vários modelos animais de ansiedade (Sena et al., 2003; Bueno et al, 2005a, b; Zanoveli et al, 2003). Um destes modelos, o LTE, foi desenvolvido a partir do LCE, e permite o estudo de duas respostas comportamentais de defesa, a esquivia inibitória e a fuga dos braços abertos, em um mesmo rato. Em termos clínicos, estas duas respostas têm sido respectivamente relacionadas ao TAG e ao TP. No LTE, o papel dos sistemas serotoninérgicos da AM, SCPD, e mais recentemente do HM, sobre as respostas comportamentais de defesa medidas no modelo tem sido bastante investigado. Por outro lado, existem poucos estudos sobre o papel exercido, especificamente, pela área septal lateral sobre as duas tarefas medidas nesse modelo, muito embora a região mencionada tenha sido relacionada à modulação da ansiedade.

O objetivo do presente trabalho é dar continuidade à investigação da ação desempenhada pela 5-HT sobre a ansiedade, salientando, entretanto, a mediação realizada por receptores 2A/2C da área septo dorso lateral – região que também recebe inervação serotoninérgica oriunda do NDR - sobre o comportamento de ratos submetidos ao LTE. Para tanto, no presente estudo, ratos Wistar machos foram administrados unilateralmente intra-septo lateral com o agonista 2A/2C DOI ou com o agonista 2C seletivo MK-212 e dez minutos depois testados no modelo do LTE (experimento 1). Um segundo grupo de animais foi administrado intra-septo dorso lateral com o antagonista de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> quetanserina e posteriormente também testado no LTE (experimento 2). No terceiro e último experimento, observou-se os efeitos do antagonismo do DOI pela quetanserina (grupos

veículo/salina, veículo/DOI, quetanserina/salina e quetanserina/DOI). Após serem submetidos ao LTE, todos os animais foram expostos a um campo aberto para a avaliação da atividade locomotora.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 250-280 g no dia da cirurgia, provenientes do Biotério Central (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo, Campus Vila Clementino. Os animais foram alojados em gaiolas-viveiro com, no máximo, cinco animais cada, na sala de guarda de animais do Campus Baixada Santista, com ciclo claro-escuro de 12 horas (claro, das 07h00min às 19h00min) e temperatura de 22°C ( $\pm$  1°C). Durante todo o experimento, os animais tiveram livre acesso à água e à comida. Após a cirurgia, foram acomodados em gaiolas com tampa alta, aos pares, onde permaneceram por mais sete dias, quando foram iniciados os experimentos.

#### 3.2. DROGAS

Foram utilizados: DOI (RBI; USA; doses de 8 e 16 nmoles), quetanserina (SIGMA; USA; doses de 10 e 20 nmoles) e MK-212 (SIGMA; USA; doses de 0,1 e 1 nmoles). O DOI e o MK foram diluídos em salina (cloreto de sódio 0,9%), a quetanserina foi dissolvida em salina estéril 0,9% e Tween 80 (Sigma, EUA) a 2%. Os animais do grupo controle do DOI e MK receberam salina 0,9%, os do grupo controle da quetanserina, salina 0,9% e Tween 80 a 2%. As drogas foram microinjetadas em volume de 0,2  $\mu$ l. Todas as drogas foram conservadas em freezer, em eppendorfs, contendo 20  $\mu$ l cada, até o dia dos experimentos. O que sobrava dos eppendorfs após as microinjeções não foi reutilizado.

#### 3.3. APARELHOS EXPERIMENTAIS

##### LABIRINTO EM T ELEVADO

O aparelho foi confeccionado em madeira, com três braços de iguais dimensões (50x12 cm). Um braço fechado, por paredes com 40 cm de altura, permanecia disposto perpendicularmente aos braços abertos opostos, os quais foram circundados por acrílico transparente de 1 cm de altura para evitar a queda dos animais. Todo o conjunto permaneceu elevado a 50 cm do solo.



Figura 1: Labirinto em T elevado para análise de duas tarefas comportamentais: esquiiva inibitória e a fuga.

### CAMPO ABERTO

Foi utilizada uma arena de madeira (60x60 cm), circundada por paredes de 40 cm e com o assoalho dividido em 16 partes de 20 cm.



Figura 2: Campo aberto para medida da atividade locomotora.



### 3.4. PROCEDIMENTOS

#### CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Cinco a dez minutos antes da cirurgia estereotáxica, cada animal foi anestesiado intraperitonealmente (IP) com Quetamina (80 mg/Kg; Agribands, Brasil) e Xilazina (10 mg/Kg; Agribands, Brasil). Em seguida, os animais foram afixados ao aparelho estereotáxico (Insight, Brasil), com a barra dos incisivos 2,5 mm abaixo da linha interaural. Imediatamente após, receberam subcutaneamente o anestésico local, cloridrato de lidocaína (Lidocaína 3%, PROBEM, Brasil), assim como pentabiótico veterinário (0,2 ml) intra-muscularmente (Fort Dodge, Brasil) e o anti inflamatório Flunixin meglumine (1 ml/Kg, SC; Banamine; Fort Dodge, Brasil). Após a exposição do crânio e da devida assepsia do local, dois pequenos orifícios foram abertos: um para o parafuso, com o intuito de auxiliar a fixação de uma prótese de acrílico, e um para a inserção da cânula-guia. Foram utilizadas cânulas-guia de 10 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro externo, inseridas a partir do Bregma, de acordo com as seguintes coordenadas: + 0,5 mm ântero-posterior; + 1,9 mm látero-medial; – 3,3 mm dorso-ventral e com uma inclinação de 14° (Paxinos e Watson, 1986). Um mandril de aço inoxidável foi introduzido em cada cânula-guia para evitar possíveis obstruções.

#### HABITUAÇÃO

No quinto e no sexto dia após a cirurgia, cada animal foi levado para a sala de teste para ser habituado às condições experimentais. Neste local, o animal foi manuseado pelo experimentador por 5 minutos e, em seguida, colocado em uma gaiola de acrílico com serragem no assoalho, onde permaneceu por outros 5 minutos. Esta mesma gaiola foi utilizada, posteriormente, como coadjuvante na execução do teste do labirinto em T elevado. Tanto nos dias da habituação quanto no dia de teste, a sala experimental estava iluminada com uma lâmpada de 40 W (50 lux), e houve um ruído constante fornecido pelo exaustor de ar.

## PRÉ-EXPOSIÇÃO FORÇADA A UM DOS BRAÇOS ABERTOS DO LABIRINTO EM T ELEVADO

Este procedimento foi realizado 24 horas antes dos testes com o LTE. Para isto, cada animal foi colocado individualmente em um dos braços abertos do labirinto em T elevado por 30 minutos. Este braço aberto foi isolado do braço fechado e do outro braço aberto por uma parede de madeira (50 cm de comprimento por 12 cm de largura). Tem sido demonstrado que esta pré-exposição forçada a um dos braços abertos do LTE potencializa a expressão do comportamento de fuga, reduzindo reações comportamentais à novidade (Teixeira et al, 2000).

## TESTES COMPORTAMENTAIS

No sétimo dia após a cirurgia, os animais foram testados no LTE e subsequentemente submetidos a um campo aberto. Inicialmente, cada animal foi levado individualmente à sala experimental e recebeu a injeção intra-septo dorso lateral, unilateralmente, do agonista 2A/2C DOI (doses de 8 e 16 nmoles), do agonista preferencial 2C MK-212 (doses de 0,1 e 1 nmoles) ou de salina (experimento 1), ou do antagonista serotoninérgico 2A/2C quetanserina (doses de 10,0 e 20,0 nmoles) ou veículo (experimento 2). Dez minutos após a microinjeção, os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Para o experimento 3, os animais recebiam a intervalos de 10 min, a injeção de veículo/salina, veículo/DOI (dose de 8 nmoles), quetanserina/salina (dose de 10 nmoles), ou quetanserina/DOI (10 nmoles e 8 nmoles, respectivamente).

Todas as microinjeções foram feitas por meio de agulhas dentais de 12 mm com 0,2 mm de diâmetro externo (Mizzy), conectadas a uma seringa Hamilton de 10 ml através de um

tubo de polietileno (PE-10), o qual estava preenchido com água destilada. As microinjeções foram realizadas, unilateralmente, pela cânula-guia, subseqüentemente à remoção dos mandris. Após a introdução da agulha dental, deu-se início à administração das drogas ou veículo utilizando-se de uma bomba microinjetora digital. O deslocamento de uma bolha de ar no polietileno foi utilizado para verificar se a droga foi realmente injetada. Em todos os experimentos, um volume de 0,2 µl foi administrado por um período de dois minutos. Após a administração, as agulhas permaneceram por 60 segundos adicionais no interior da cânula-guia para evitar refluxos.

Os testes comportamentais foram constituídos da obtenção de duas medidas avaliadas no modelo do LTE: esquiva inibitória e fuga de uma via. Para a verificação da esquiva inibitória no LTE, os animais foram colocados na extremidade distal do braço fechado, com a cabeça voltada para o centro do aparelho. Cronometrou-se a latência de saída, com as quatro patas, do braço fechado em direção ao aberto (latência basal). O animal foi, então, retirado do LTE e colocado em uma caixa, por 30 segundos. Em seguida, a mesma medida foi tomada por mais duas vezes consecutivas (latências de Esquiva Inibitória 1 e 2), com intervalo de 30 segundos entre elas. O animal foi então colocado na extremidade do braço aberto para registro do tempo de saída deste braço com as quatro patas (Fuga 1). Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes consecutivas, com intervalos de 30 segundos entre elas, para a aquisição das medidas de Fuga 2 e Fuga 3.

Trinta segundos após a última medida de fuga, o animal foi colocado no campo aberto e filmado por 5 min para posterior registro de número de cruzamentos e levantamentos.

Após cada sessão de teste, o labirinto e o campo aberto foram submetidos à limpeza com uma solução de álcool a 20%.

### 3.5. PERFUSÃO

Após os experimentos, os animais foram sacrificados sob anestesia profunda com uretana a 25% (10 ml/kg) e, em seguida, foram perfundidos intracardiacamente, com salina (NaCl a 0,9%) seguida por formol a 10%. Previamente à perfusão era injetado 0,2 µl de corante azul de Evans 1% por uma microagulha (Mizzy, 12 mm) inserida pela cânula guia. Os cérebros corados e perfundidos eram então removidos e fixados em formol a 10% por um período mínimo de três dias.

### 3.6. HISTOLOGIA

Os cérebros foram cortados em secções coronais de 60 µm de espessura em um criostato de congelamento (Leica CM1851) para verificação macroscópica do sítio de microinjeção, segundo as fotomicrografias do atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (1986).

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados comportamentais foram testados para homogeneidade. Em caso de resultados heterogêneos, foram analisados os dados após a obtenção do qui-quadrado das variáveis. Para os experimentos 1 e 2, os dados experimentais foram submetidos a uma análise de variância ANOVA para medidas repetidas, tendo como fator independente o tratamento efetuado e como medidas repetidas as latências de saída dos braços fechados (Linha de Base, Esquiva 1, Esquiva 2) ou as latências de fuga (Fuga 1, Fuga 2, Fuga 3). No caso de efeitos significativos, os dados eram submetidos ao teste *post-hoc* de Duncan. Para o experimento 3, os dados experimentais do LTE foram submetidos a uma ANOVA de três fatores, tendo os dois tratamentos (tratamento 1: veículo ou quetanserina; tratamento 2: salina

ou DOI) como fatores independentes e as latências de saída como fator dependente (Linha de Base, Esquiva 1, Esquiva 2 ou Fuga 1, Fuga 2, Fuga 3). Os efeitos significativos dos fatores independentes ou da interação entre os fatores foram analisadas pelo teste *post-hoc* de Duncan.

Os dados da atividade locomotora no campo aberto foram submetidos a uma ANOVA de uma via (experimentos 1 e 2) ou a uma ANOVA de dois fatores (experimento 3), seguida do teste *post-hoc* de Duncan. Um valor de  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 4. RESULTADOS

A figura 3 mostra os sítios de microinjeção na área septal de ratos tratados com DOI, MK-212, quetanserina e seus respectivos grupos controle.

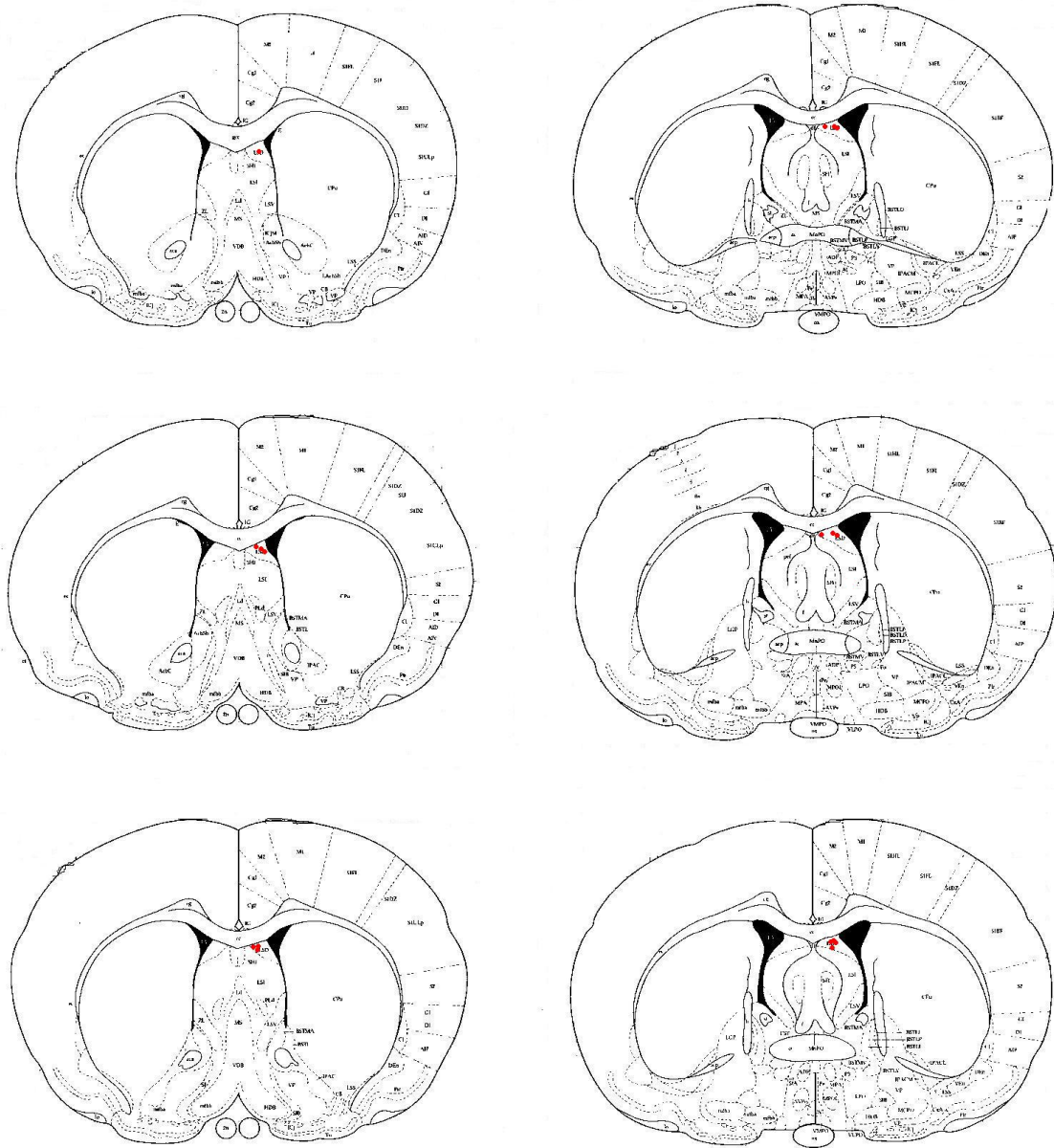


Figura 3 – Sítios de microinjeção intra-septo dorso lateral (pontos vermelhos). As figuras representam as coordenadas do Atlas Paxinos e Watson 1986). O número de pontos na figura é inferior ao número total de ratos usados devido às várias sobreposições.

**TABELA 2**

Atividade locomotora no campo aberto após as injeções das drogas no septo dorsolateral.

Drogas (nmol)	Números	
	Cruzamentos	Levantamentos
Salina	77.00 ± 8.16	16.53 ± 1.97
DOI (8)	51.42 ± 9.50	12.14 ± 2.86
DOI (16)	68.75 ± 6.71	13.00 ± 1.31
MK-212 (0,1)	64.00 ± 6.47	17.86 ± 2.19
MK-212 (1)	82.42 ± 8.71	20.85 ± 2.40
Veículo	79.16 ± 12.0	15.50 ± 4.51
Quetanserina (10)	63.36 ± 5.02	14.64 ± 1.74
Quetanserina (20)	59.78 ± 4.48	14.77 ± 1.23
Veículo/Salina	58.13 ± 6.53	15.63 ± 2.99
Veículo/DOI (8)	50.86 ± 7.89	12.28 ± 2.06
Quetanserina (10)/Salina	59.00 ± 7.54	13.83 ± 2.36
Quetanserina (10)/DOI (8)	78.00 ± 11.23	15.67 ± 1.89

#### 4.1. DOI E MK-212

A figura 4 (painel superior) demonstra o efeito da administração de DOI e MK-212 intra-septo dorso lateral sobre a esquiva inibitória dos braços abertos do modelo. Observa-se que o tratamento com DOI aumentou significativamente a esquiva inibitória. O MK-212 foi desprovido de efeito. A ANOVA para medidas repetidas indicou efeito significativo do tratamento [ $F(4,37) = 2,58$ ;  $p < 0,05$ ] e das tentativas [ $F(2,74) = 12,95$ ;  $p < 0,001$ ], mas não da interação tratamento versus tentativas [ $F(8,74) = 1,18$ ; NS]. O teste de Duncan indicou que na esquiva 1 as duas doses de DOI foram significativamente maiores quando comparadas ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A figura 4 (painel inferior) demonstra o efeito da administração do DOI e MK-212 intra-septo dorso lateral sobre a fuga do braço aberto do modelo. A ANOVA para medidas repetidas indicou efeito significativo das tentativas [ $F(2,74) = 10,38$ ;  $p < 0,001$ ], mas não

indicou efeito do tratamento [ $F(4,37) = 1,34$ ; NS] ou na interação tratamento versus tentativa [ $F(8,74)=1,67$ ; NS].

A ANOVA de uma via mostrou que não houve diferenças significativas nos animais tratados com DOI, MK-212 ou salina nas medidas realizadas no campo aberto. Nem o número de cruzamentos [ $F(4,37) = 2,82$ ; NS] nem o número de levantamentos [ $F(4,37) = 1,88$ ; NS] foram alterados pelas drogas administradas (tabela 2).



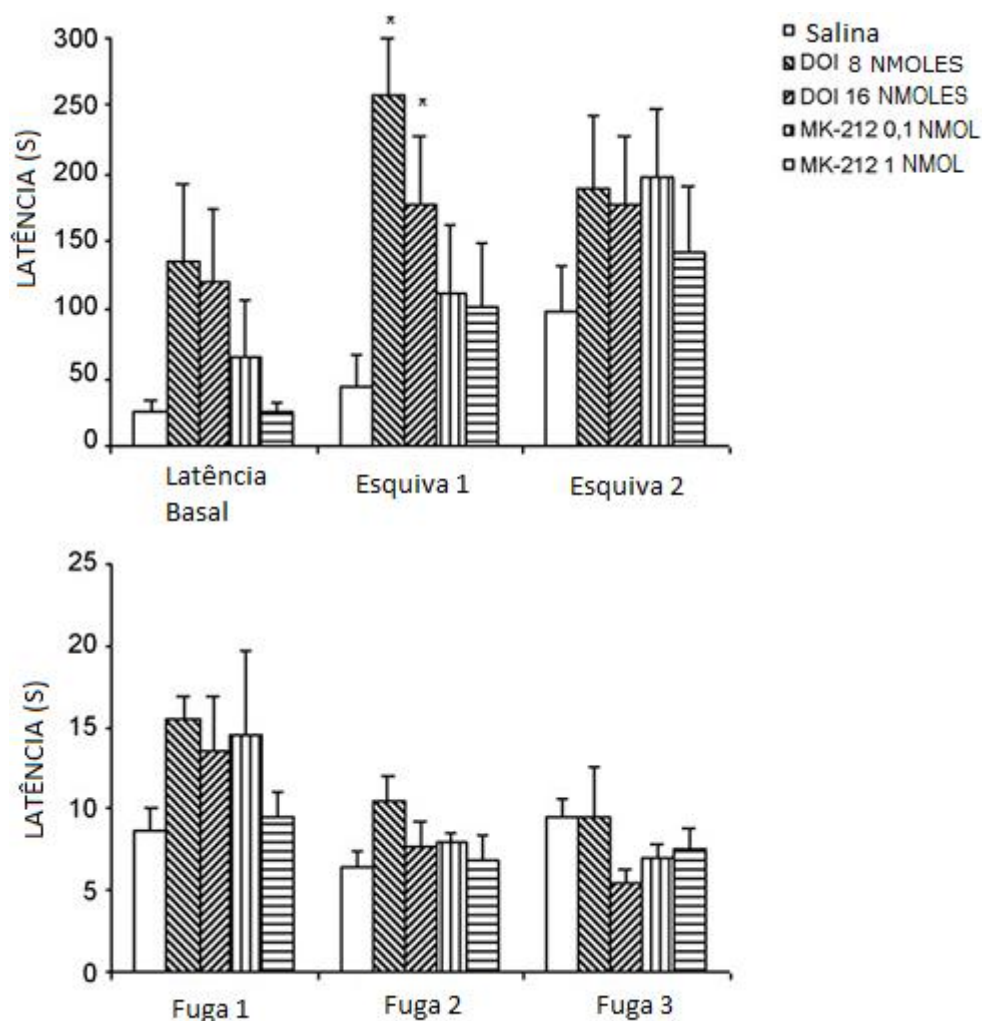


Figura 4: Efeito do DOI (8 e 16 nmoles/0,2µl), do MK-212 (0,1 e 1 nmoles/0,2µl) e da salina (0,2 µl) intra-septo dorso lateral sobre as medidas de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos braços abertos do LTE. Barras representam média  $\pm$  EPM para 13 animais tratados com salina, 7 com 8 nmoles, 8 com 16 nmoles de DOI, 7 com 0,1 nmoles e 7 com 1 nmol de MK. As medidas de Latência Basal, Esquiva 1, Esquiva 2, Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3 foram realizadas com 30 segundos de intervalo entre cada, começando 10 minutos após a microinjeção de droga ou salina. \* $P \leq 0,05$ , em relação ao grupo salina na mesma tentativa (ANOVA seguida do teste post-hoc de Duncan).

#### 4. 2. Quetanserina

A figura 5 (painel superior) demonstra o efeito da administração de quetanserina intra-septo dorso lateral sobre a esquiva inibitória dos braços abertos do modelo. Como o MK-212, a quetanserina não apresentou alterações desta medida. A ANOVA para medidas repetidas indicou efeito significativo das tentativas [ $F(3,46) = 6,57$ ;  $p < 0,001$ ], mas não do tratamento

[ $F(2,23) = 0,59$ ; NS] e nem da interação tratamento versus tentativas [ $F(4,46)=0,23$ ; NS]. O teste de Duncan não indicou resultados significativos em nenhuma das três medidas de esquiva ( $p>0,05$ ).

A figura 5 (painel inferior) demonstra o efeito da administração da quetanserina intra-septo dorso lateral sobre a fuga do braço aberto do modelo. A ANOVA para medidas repetidas indicou efeito significativo das tentativas [ $F(2,46) = 4,57$ ;  $p < 0,05$ ], mas não do tratamento [ $F(2,23) = 0,45$ ; NS] ou da interação tratamento versus tentativa [ $F(4,46) = 0,66$ ; NS].

A ANOVA mostrou que não houve alterações significativas no comportamento dos animais tratados com a quetanserina ou com veículo no campo aberto. O número de cruzamentos [ $F(2,23) = 1,97$ ; NS] e o número de levantamentos [ $F(2,23) = 0,03$ ; NS] não foram significativamente alterados pela administração da droga (tabela 2).

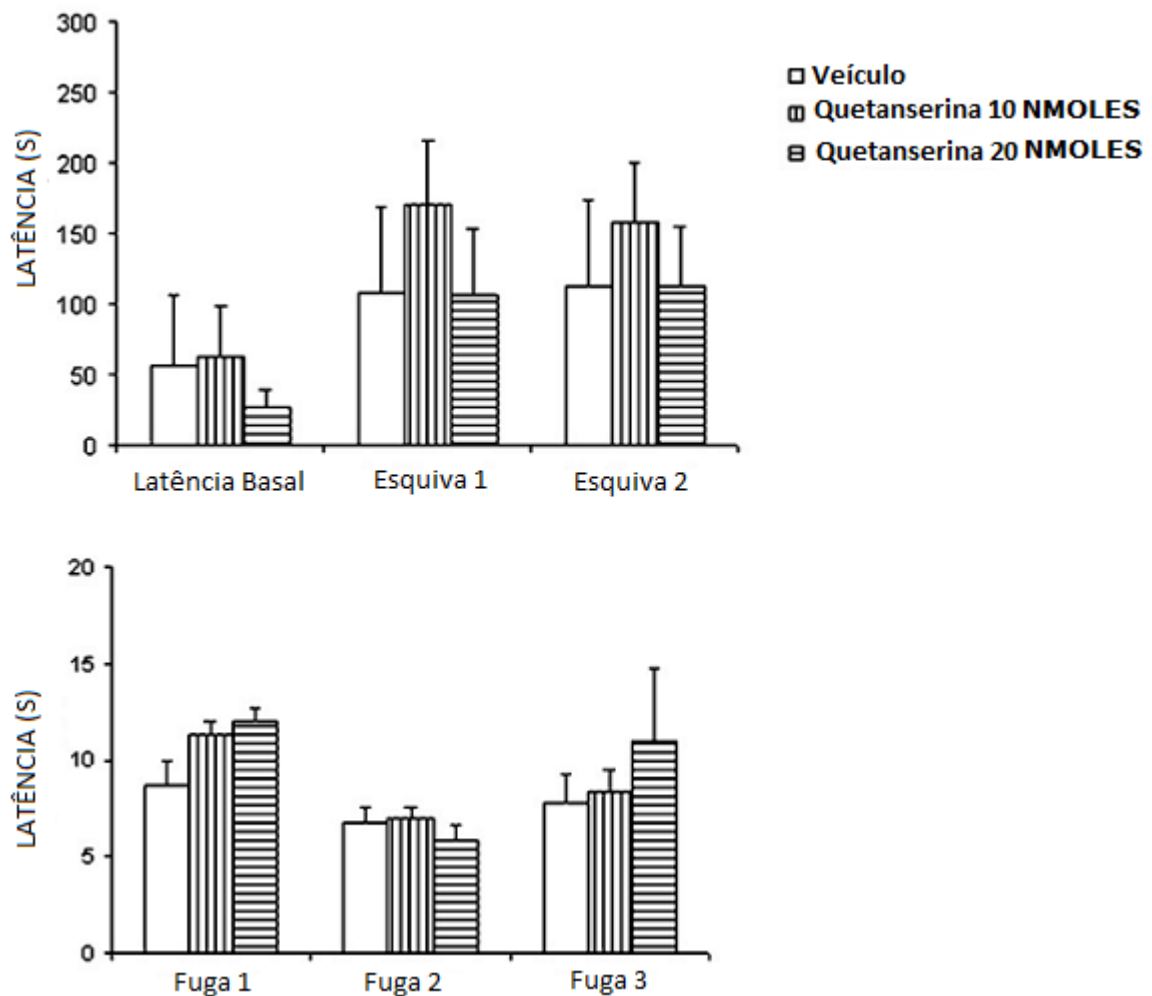


Figura 5: Efeito da quetanserina (10 e 20 nmoles/0,2 $\mu$ l) ou do veículo (0,2  $\mu$ l) intra-septo dorso lateral sobre as medidas de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos braços abertos do LTE. Barras representam média  $\pm$  EPM para 7 animais tratados com veículo, 11 com 10 nmoles e 9 com 20 nmoles de quetanserina. As medidas de Latência Basal, Esquiva 1, Esquiva 2, Fuga 1, Fuga 2 e Fuga 3 foram realizadas com 30 segundos de intervalo entre cada, começando 10 minutos após a microinjeção de droga ou veículo.

#### 4.3. Antagonismo

A figura 6 (painel superior) demonstra o efeito do antagonismo sobre a esquiva inibitória dos braços abertos do modelo. A ANOVA de três fatores indicou efeito significativo das tentativas [ $F(2,50) = 15,24$ ;  $p < 0,001$ ] e na interação DOI *versus* tentativas [ $F(2,50) = 4,35$ ;  $p < 0,05$ ], mas não houve efeito significativo da quetanserina *versus* tentativas [ $F(1,50) = 1,82$ ; NS], DOI [ $F(1,25) = 0,07$ ; NS], quetanserina [ $F(1,25) = 1,78$ ; NS], DOI *versus*

quetanserina [ $F(1,25) = 3,14$ ; NS], ou das tentativas *versus* DOI *versus* quetanserina [ $F(2,50) = 1,86$ ; NS]. O teste de Duncan indicou que na esquia 1 o grupo tratado com veículo/DOI foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) de todos os outros grupos de tratamento.

A figura 6 (painel inferior) demonstra o efeito do antagonismo sobre a fuga do braço aberto do modelo. A ANOVA de três fatores não indicou efeito significativo das tentativas [ $F(2,50) = 0,63$ ; NS], DOI [ $F(1,25) = 0,19$ ; NS], quetanserina [ $F(1,25) = 0,12$ ; NS], DOI *versus* quetanserina [ $F(1,25) = 2,29$ ; NS], tentativas *versus* DOI [ $F(2,50) = 1,27$ ; NS], tentativas *versus* quetanserina [ $F(2,50) = 0,66$ ; NS], ou das tentativas *versus* DOI *versus* quetanserina [ $F(2,50) = 0,29$ ; NS].

A ANOVA não indicou diferenças significativas entre os diferentes grupos e os seus tratamentos no campo aberto. O DOI e a quetanserina não alteraram significativamente os números de cruzamentos ou levantamentos (DOI: cruzamentos: [ $F(1,25) = 3,25$ ; NS]; levantamentos: [ $F(1,25) = 0,11$ ; NS]; quetanserina: cruzamentos: [ $F(1,25) = 2,85$ ; NS]; levantamentos: [ $F(1,25) = 0,57$ ; NS]) e não houve interação significativa entre os dois tratamentos [ $F(1,25) = 0,57$ ; NS] (tabela 2).

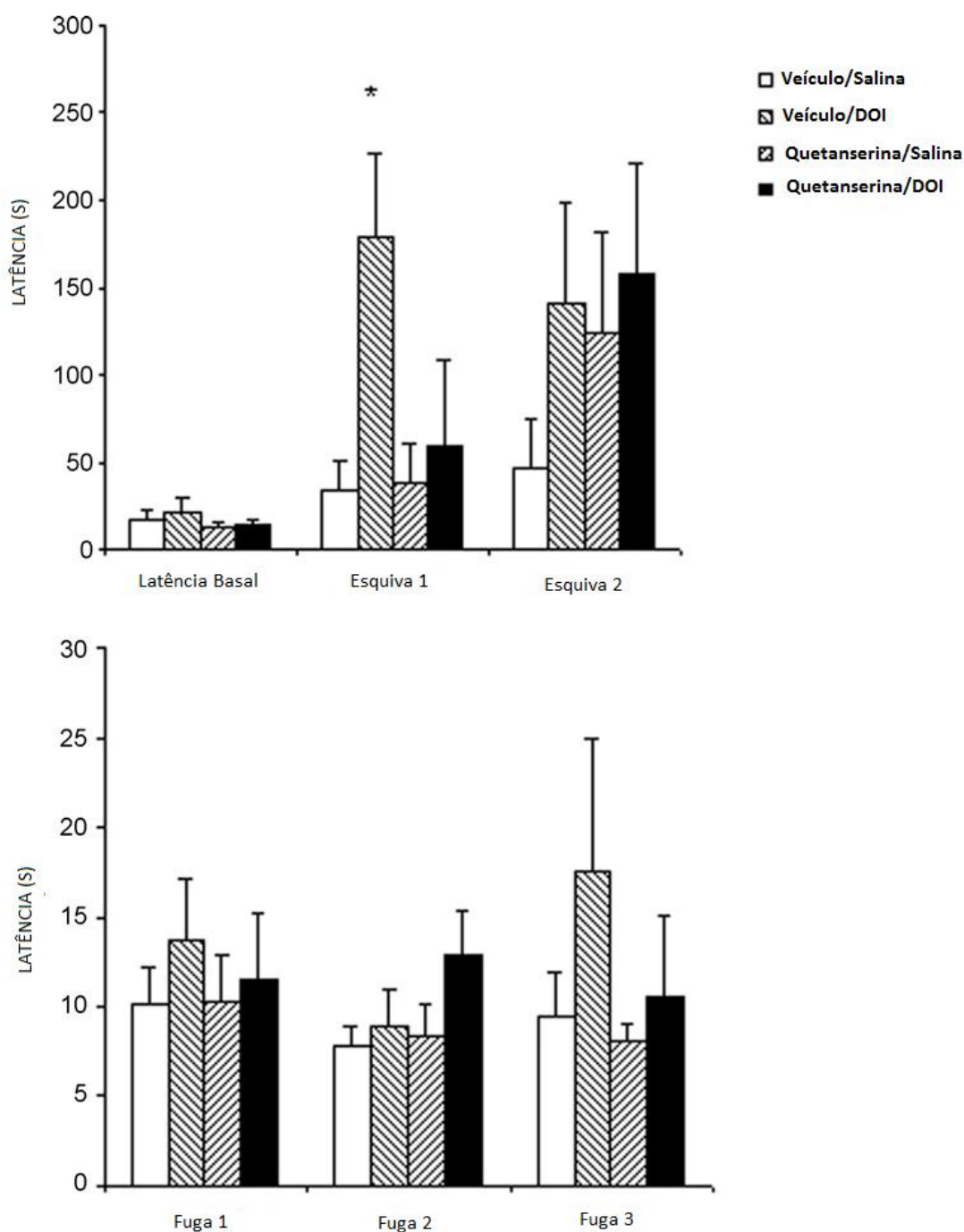


Figura 6: Efeitos da injeção intra septo dorso lateral da quetanserina (10 nmoles/0,2  $\mu$ l) ou veículo (0,2  $\mu$ l) ou DOI (8 nmoles/0,2  $\mu$ l) ou salina (0,2  $\mu$ l) sobre as medidas de esquiva inibitória (painel superior) e fuga (painel inferior) dos braços abertos do LTE. Barras representam médias  $\pm$  EPM para 6 animais tratados com salina/veículo, 7 com veículo/DOI, 6 com quetanserina/salina e 6 com quetanserina/DOI. \* $P \leq 0,05$ , em relação ao grupo veículo/salina na mesma tentativa; + $P \leq 0,05$ , em relação aos demais grupos na mesma tentativa (ANOVA seguida do teste post-hoc de Duncan).

## 5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel de receptores serotoninérgicos 2A/2C do septo dorso lateral na modulação de respostas defensivas geradas pelo LTE, um modelo animal de ansiedade que permite avaliar duas respostas de defesa no mesmo animal, a esquiva inibitória e a fuga (Graeff et. al, 1993; Viana et. al, 1994; Teixeira et. al, 2000; Poltronieri et. al, 2003).

Nossos resultados mostraram que a administração intra-septo dorso lateral do agonista preferencial 5-HT<sub>2A</sub> DOI aumentou a latência de esquiva inibitória, um efeito ansiogênico, sem alterar o comportamento de fuga. A ausência de efeitos do DOI na fuga do LTE não deve ser entendida como relacionada ao fato da droga não encontrar-se mais biologicamente ativa quando estas respostas comportamentais foram avaliadas, uma vez que, estudos anteriores, realizados com a administração do DOI em outras estruturas encefálicas, mostraram efeitos da droga na tarefa de fuga, mesmo quando os animais foram testados 20 minutos após a infusão (Zanoveli et. al, 2005; De Paula Soares et. al, 2004). Os resultados do presente estudo também demonstram que a administração intra-septo lateral do agonista seletivo 5-HT<sub>2C</sub> MK-212 ou do antagonista preferencial 5-HT<sub>2A</sub> quetanserina não alteraram os comportamentos avaliados no LTE (esquiva ou a fuga), embora a última droga (quetanserina) tenha sido capaz de antagonizar os efeitos induzidos pelo DOI. Nenhum efeito significativo foi observado, com nenhuma das drogas testadas, no campo aberto, o que possibilita a afirmação de que os resultados obtidos no LTE não são devido a alterações motoras.

Os resultados ansiogênicos observados com o DOI são muito semelhantes aos anteriormente obtidos com a administração bilateral intra-septo lateral do agonista serotoninérgico 1A/7 8-OH-DPAT (Viana et al, 2008). Como o DOI, o 8-OH-DPAT administrado intra-septo lateral facilitou a aquisição da esquiva inibitória do LTE, sem alterar

a fuga. Corroborando esses resultados, nossos dados sugerem que não apenas a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mas também a ativação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> do septo lateral, modula um determinado subtipo de resposta defensiva (a esquiva do LTE), que envolve inibição comportamental. Na verdade, o septo (incluindo os seus aspectos lateral e medial) e o hipocampo têm sido considerados como as estruturas principais do chamado "Sistema de Inibição Comportamental" (Gray, 1987; Gray et. al, 2001; McNaughton et. al, 2004). De acordo com Gray e McNaughton (Gray, 1987; Gray et. al, 2001), esse sistema é ativado por situações ameaçadoras que envolvem comportamento de aproximação (por exemplo, procurar comida em uma área previamente visitada por um predador). Esse comportamento é caracterizado pela inibição comportamental, avaliação de risco e aumento da vigilância. Em situações de conflito que envolvem aproximação/evitação, a avaliação de risco reduziria o nível de ameaça, enquanto que a inibição comportamental reduziria o risco em casos de perigo real. Com base em estudos farmacológicos que demonstram que estas respostas comportamentais respondem ao tratamento com drogas ansiolíticas, como o diazepam e a buspirona, elas têm sido associadas ao TAG (Gray et al, 2001; McNaughton et al, 2004).

Corroborando nossos resultados, um estudo anterior realizado por Massé e colaboradores (2008) mostrou que a administração do DOI na amígdala ou na substância cinzenta periaquedutal – estruturas, como o septo lateral, implicadas com a defesa – exerce efeitos ansiogênicos no teste das quatro placas. A administração do DOI no hipocampo, por outro lado, mostrou resultados ansiolíticos (Massé et al, 2008). Resultados ansiolíticos também foram obtidos com a tarefa de esquiva do LTE, quando o DOI foi administrado intra-hipotálamo ventromedial (Silva et al, 2011). Os autores discutem esses últimos resultados, aparentemente contraditórios aos nossos, como possivelmente relacionados a um mecanismo GABAérgico, já que antagonistas GABAérgicos bloqueiam os efeitos ansiolíticos do DOI

(Massé et al, 2007). Esta hipótese é também baseada em estudos que mostraram: (1) inibição da neurotransmissão GABAérgica em resposta ao bloqueio de receptores 5-HT2A (Cozzi et al, 1996), e (2) co-localização de receptores 5-HT2A em populações de células GABAérgicas (Griffiths et al, 2002).

Neste sentido, é importante ressaltar que um número significativo de receptores 5-HT2A do septo lateral encontra-se localizado em interneurônios GABAérgicos (Luttgen et al, 2004). Isso também explica por que a ativação de ambos os receptores 5-HT1A e 5-HT2A no septo lateral resultou no mesmo efeito comportamental, embora a estimulação desses receptores induza efeitos celulares opostos. Enquanto a ativação de receptores 5-HT1A aumenta a permeabilidade da membrana ao potássio (Aghajanian, 1995), a ativação de receptores 5-HT2A induz despolarização, neste caso de interneurônios GABAérgicos, aumentando os níveis de cálcio intracelular (Hoyer et al, 2002). Tendo em vista que neurônios GABAérgicos do septo se projetam para interneurônios GABAérgicos da formação hipocampal (Freund e Antal, 1988), que inibem a atividade de neurônios piramidais, pelo menos teoricamente, a ativação de interneurônios GABAérgicos no septo lateral poderia aumentar a desinibição de neurônios piramidais do hipocampo (Luttgen et al, 2004), acarretando um aumento nas respostas mediadas pelo sistema septo-hipocampal (p.ex., respostas que envolvem inibição comportamental, como a esquia do LTE). Isto também explicaria por que a injeção de DOI no septo lateral e hipocampo exercem efeitos opostos, no primeiro caso ansiolítico e no segundo ansiogênico. Os efeitos ansiolíticos no hipocampo se dariam em função da ativação de interneurônios GABAérgicos hipocampais, que por sua vez, inibem neurônios piramidais; os ansiogênicos, em função da ativação desses mesmos neurônios no septo, que inibiriam os interneurônios GABAérgicos no hipocampo, resultando em ativação de neurônios piramidais, conforme exposto acima.



Diferentemente do DOI, o agonista serotoninérgico 2C MK-212, pelo menos na faixa de doses administradas, não alterou significativamente nenhum comportamento medido no LTE. Estudos prévios têm mostrado efeitos controversos de agonistas 5-HT<sub>2C</sub> em modelos animais de medo/ansiedade (Whitton et. al, 1990; Alves et. al, 2004; Cornélio et. al, 2007). Por exemplo, enquanto a administração do MK-212 na substância cinzenta periaquedutal, amígdala basolateral e no hipocampo ventral, em intervalos de doses semelhantes ao usado no presente estudo, exerce efeitos ansiogênicos (Yamashita et al, 2011; Alves et al, 2004; Vicente et al, 2011), não foram observados resultados significativos quando a mesma droga foi administrada no hipocampo dorsal (Alves et al, 2004). Adicionalmente, a administração direta de mCPP, um agonista não seletivo dos receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub>, no hipocampo diminuiu o tempo de interação social de ratos, o que é indicativo de efeito ansiogênico (Whitton et al, 1990). Por outro lado, em ratos expostos ao labirinto em cruz elevado o mCPP não alterou o comportamento dos animais, quando administrado no hipocampo dorsal ou ventral (Cornélio et al, 2007). Estes resultados chamam a atenção para os complexos mecanismos pelos quais a serotonina regula respostas defensivas e reforçam a idéia de que diferentes vias e subtipos de receptores estão envolvidos no controle de tipos distintos de respostas comportamentais e transtornos de ansiedade (Graeff FG, 2004; Massé et. al, 2008; Petit-Demoulière et. al, 2009; Graeff et. al, 2010; Yamashita et. al, 2011; Vicente et. al, 2011).

Como o MK-212, a quetanserina também não alterou significativamente o comportamento dos animais no LTE. Corroborando nossos resultados, estudos prévios realizados com a administração de quetanserina na substância cinzenta periaquedutal ou no hipotálamo ventromedial também demonstraram ausência de efeito da droga nas tarefas de esquiva e fuga do LTE (De Paula et al, 2004; Zanoveli et al, 2005; Silva et al, 2011). Neste sentido é possível afirmar que, em condições fisiológicas, a ativação de receptores

serotonérgicos nestas regiões encefálicas não é necessária para a expressão das respostas defensivas do LTE; em outras palavras, a serotonina exerce uma influência fásica e não tônica na modulação de respostas defensivas (De Paula et al, 2004; Zanoveli et al, 2005; Silva et al, 2011).

Levando em consideração os resultados obtidos no presente estudo, é possível afirmar que os receptores serotonérgicos 2A, mas não os 2C, do septo dorso lateral estão envolvidos com a modulação de uma resposta de defesa específica, a esquiva inibitória do LTE, e que uma falha neste mecanismo de regulação pode estar relacionada à fisiopatologia do transtorno de ansiedade generalizada.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. AGHAJANIAN, G. K. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: Bloom FR, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven, 1995. p. 1451–9.
2. ALVES, S. H. et al. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT(2C) agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behavioral Pharmacology*, 15:37–43, 2004.
3. BUENO, C.H. et al. Panicolytic-like effect induced by the stimulation of GABAA and GABAB receptor in the dorsal periaqueductal grey of rats. *European Journal of Pharmacology*, 516:239-246, 2005a.
4. BUENO, C.H. et al. The reversible inactivation of the amygdala basolateral nucleus causes anxiolytic effect in the rat elevated T-maze and light/dark transition tests. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(11):1697-701, 2005b.
5. CHEETA, S.; KENNY, P. J.; FILE, S. E. The role of 5-HT1A receptors in mediating the anxiogenic effects of nicotine following lateral septal administration. *European Journal of Neuroscience* 1, 2:3797–802, 2000.
6. CORNÉLIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*, 178: 82–9, 2007.
7. COZZI, V. N.; NICHOLS, D. E.; 5-HT2A receptor antagonists inhibit potassium stimulated-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *European Journal of Pharmacology*, 309:25–31, 1996.
8. DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology*, 5(4):305-315, 1991.

9. DE PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI, J. R. H. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin*, 64:181–8, 2004.
10. FILE, S. E.; HYDE, J. R. G. Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, 62:19-24, 1978.
11. FILE, S. E. et al. Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology*, 111: 491-494, 1993.
12. FREUND, T. F.; ANTAL, M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature*, 336:170–3, 1988.
13. GRAEFF, F. G. et al. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26:67-70, 1993.
14. GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. *Fundamentos de Psicofarmacologia*. São Paulo, Atheneu, 2000.
15. GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes R (eds.), *Handbook of Anxiety*, vol. 3. Amsterdam, Elsevier Science Publishers. p. 307-354, 1990.
16. GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:239–59, 2004.
17. GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, J. R. H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Central Nervous System Agents in Medical Chemistry*, 10:207–17, 2010.

18. GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Burrows GD, Noyes R (eds.), *Handbook of Anxiety*, vol. 3. Amsterdam. Elsevier Science Publishers. pp. 307-354, 1990.
19. GRAEFF, F. G. et al. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 23(2):237-46, 1998.
20. GRAY, J. A. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford. Oxford University Press, 1987.
21. GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford: Oxford University Press, 2001.
22. GRIFFITHS, J. L.; LOVICK, T. A. Co-localization of 5-HT<sub>2A</sub>-receptor- and GABA immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroscience Letters*, 326:151–4, 2002.
23. HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptor. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71: 533-554, 2002.
24. KISER, R. S.; LEOVITZ, R. M. Monoaminergic mechanisms in aversive brain stimulation. *Physiology and Behavior*, 15: 47-53, 1975.
25. LUTTGEN, M.; ÖGREN, O. S.; MEISTER, B. Chemical identity of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. *Brain Research*, 1010:156–65, 2004.
26. MASSÉ, F. et al. Anxiolytic-like effects of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four plates test. *Behavioral Brain Research*, 188:291–7, 2008.

27. MASSÉ, F. et al. Anxiolytic-like effects of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four plates test. *Behavioral Brain Research*, 188:291–7, 2008.
28. MASSÉ, F.; HASCÖET, M.; BOURIN, M. Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist) in the four-plate test. *European Neuropsychopharmacology*, 17:483–91, 2007.
29. MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28:285–305, 2004.
30. MENARD, J.; TREIT, D. Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. *Physiology and Behavior*, 60(3): 845-853, 1996.
31. PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York, Academic Press, 1986.
32. PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167, 1985.
33. PETIT-DEMOULIERE, B. et al. Brain structures implicated in the four-plate test in naïve and experienced Swiss mice using injection of diazepam and the 5-HT<sub>2A</sub> agonist DOI. *Behavioral Brain Research*, 204:200–5, 2009.
34. POLTRONIERI, S. C. et al. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behavioral Brain Research*, 147(1-2):185-92, 2003.
35. RAISMAN, G. The connections of the septum. *Brain Research*, 89: 317-349, 1966.

36. SENA, L. M. et al. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behavioural Brain Research*, 142:125-133, 2003.
37. SILVA, E. S. et al. Facilitation of 5-HT(2A/2C)-mediated neurotransmission in the ventromedial hypothalamic nucleus decreases anxiety in the elevated T-maze. *Behavioral Brain Research*, 216:692–8, 2011.
38. STEIN, L.; WISE, C. D.; BERGER, B. D. Antianxiety action of benzodiazepines: decrease in activity of serotonin neurons in the punishment system. In: Garattini, S.; Mussini, E.; Randall, L.O., (eds.), *Benzodiazepines*. Raven Press: New York, 1973, pp. 299-326.
39. SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. The connections of the septal region in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 186: 621-656, 1979.
40. TEIXEIRA, R. C. et al. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T maze model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 65(4): 571-576, 2000.
41. THOMAS, E.; YADIN, E.; STRICKLAND, C. E. Septal unit activity during classical conditioning: a regional comparison. *Brain Research*, 547: 303-308, 1991.
42. TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44:463–9, 1993.
43. VIANA, M. B. et al. 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89(3):360-6, 2008.
44. VIANA, M. B. et al. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 50(3):549-554, 1994.

45. VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, J. R. H. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14:1-12, 2011.
46. WHITTON, P.; CURZON, G. Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) into the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*, 100:138-40, 1990.
47. YADIN, E. et al. The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiology and Behavior*, 53:1077-1083, 1993.
48. YAMASHITA, P.; BORTOLI, V.; ZANGROSSI, J. R. H. 5-HT<sub>2C</sub> receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology*, 60:216-22, 2011.
49. ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, J. R. H. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *European Journal of Pharmacology*, 473, 153-161, 2003.
50. ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, J. R. H. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behavioural Pharmacology*, 16:543-52, 2005.



## 7. ANEXO I – Artigo publicado.

Author's personal copy

Behavioural Brain Research 226 (2012) 50–55

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

**Behavioural Brain Research**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

Research report

## 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation in the dorsolateral septum facilitates inhibitory avoidance in the elevated T-maze

D.C. de Paula<sup>a</sup>, A.S. Torricelli<sup>a</sup>, M.R. Lopreato<sup>a</sup>, J.O.G. Nascimento<sup>b</sup>, M.B. Viana<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biosciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), Santos, SP, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Psychiatry, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

---

**ARTICLE INFO**

*Article history:*  
Received 9 August 2011  
Received in revised form 22 August 2011  
Accepted 27 August 2011  
Available online xxx

*Keywords:*  
Dorsolateral septum  
5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors  
Anxiety  
Panic  
Elevated T-maze

**ABSTRACT**

Serotonin in the lateral septum has been implicated in the modulation of defense and hence in anxiety. However, it deserves investigation how changes in 5-HT-mechanisms in this area modulate defensive responses associated with specific subtypes of anxiety disorders. We evaluated the effects of intra-dorsolateral septum (DLS) injections of the preferential 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist DOI (8 and 16 nmol), the 5-HT<sub>2C</sub> selective agonist MK-212 (0.1 and 1 nmol) and the preferential 5-HT<sub>2A</sub> antagonist ketanserin (10 and 20 nmol) in rats exposed to the elevated T-maze (ETM), a model which allows the measurement of two defensive responses: inhibitory avoidance and escape. These responses have been respectively related to generalized anxiety and panic disorder. All animals were tested in an open-field after the ETM for locomotor activity assessments. Results showed that intra-DLS DOI increased avoidance latencies, an anxiogenic effect. MK and ketanserin were without effect. Also, none of the drugs administered affected the escape performance. Ketanserin blocked the anxiogenic effect caused by DOI. No changes to locomotion were observed. The data suggests that DLS 5-HT<sub>2A</sub> receptors are involved in the control of inhibitory avoidance and that a failure in this mechanism may be of importance to the physiopathology of generalized anxiety.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

---

### 1. Introduction

The septum region is an important part of the septo-hippocampal system and has long been implicated with defense, and hence with anxiety [1–7]. In particular the lateral septum (LS) seems to play an important role in regulating anxiety-related reactions [6]. A number of different studies indicate that the LS enhances its neural activity when animals are submitted to a variety of stressful stimuli [8–14]. Furthermore, the LS contains axon terminals and expresses receptors for different neurotransmitters/neuromodulators implicated with anxiety [6].

In this last respect, previously obtained evidence suggests that the serotonergic pathway connecting the dorsal raphe nucleus (DRN) to the LS plays an important role in the mediation of defensive behavior to threatening stimuli. Thus, it has been shown that exposure of mice to a predator (a rat) results in behavioral activation, with predominant risk-assessment activities, and in increases in hippocampal, cortical, and septal serotonin (5-HT

[15]. In a similar way, stimulation of the DRN 5-HT neurons with corticotrophin-releasing factor, a neurohormone involved in the mediation of stress responses, alters 5-HT release [16] and neuronal function in the LS [17]. Facilitation of 5-HT-mediated neurotransmission in the region, by local administration of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT, has also been shown to increase the expression of defensive behavior in rats exposed to two widely used animal models of anxiety, the elevated plus-maze and the social interaction test [18,19].

It is important to point out that although the elevated plus-maze has been considered a mixed animal model of anxiety [20–22], that is, one that does not distinguish between different types of fear/anxiety, the social interaction test has been related to a specific subtype of anxiety found in clinical settings: generalized anxiety disorder [22]. Thus, corroborating the results obtained by Cheeta et al. [18,19], a previous study performed by our research group [7] has shown that intra-LS 8-OH-DPAT facilitates inhibitory avoidance in the elevated T-maze (ETM) [for a review on the test see Refs. [23–26]], without altering escape responses, an effect antagonized by the administration of the 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor antagonist WAY-100635. Based on an extensive series of pharmacological studies conducted in different laboratories, inhibitory avoidance has been related to generalized anxiety, whereas escape is associated to panic disorder [22,27–31]. Altogether these results suggest that 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the LS regulate a specific subtype of anxiety

Abbreviations: LS, lateral septum; DRN, dorsal raphe nucleus; 5-HT, serotonin; ETM, elevated T-maze; DLS, dorsolateral septum.  
\* Corresponding author at: Av. Ana Costa, 95, 11060-001 Santos, SP, Brazil.  
Tel.: +55 11 38683203; fax: +55 11 38683203.  
E-mail addresses: [m.viana@unifesp.br](mailto:m.viana@unifesp.br), [mlilenabv@gmail.com](mailto:mlilenabv@gmail.com) (M.B. Viana).

0166-4328/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.bbr.2011.08.044



reaction, reinforcing the idea of a functional segregation that underlies the different expressions of animal fear/anxiety. According to this view, there are a number of brain structures critically involved with defense. These structures are organized hierarchically, from the periaqueductal gray matter, to the medial hypothalamus, amygdala, septum-hippocampus, cingulate and frontal cortices. While the septo-hippocampal system and the amygdala, together with the ventrolateral portion of the periaqueductal gray, would be the key structures for risk-assessment and freezing behavior to potential or distal threat – defensive responses which have been related to anxiety – the medial hypothalamus and the dorsal periaqueductal gray would be responsible for the regulation of vigorous forms of active defensive behavior, such as escape or flight/fight to proximal danger [30–33].

Aside from 5-HT<sub>1A</sub> receptors, the LS also contains 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors [34–37]. In fact, it has been shown that the distributions of mRNAs for 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes overlap with regions that bind various 5-HT receptor-selective ligands and are present in nearly all areas known to receive serotonergic innervation [35]. Thus, it deserves investigation whether, as 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors of the LS also participate in the modulation of specific subtypes of defensive responses. In this respect, it has previously been shown that discrete sub-populations of 5-HT<sub>2</sub> receptors may differently regulate fear/anxiety depending on the structure in which these receptors are found [38–41]. In order to investigate the role played by 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors of the LS in the two behavioral responses measured by the ETM, in the present study animals were injected into the dorsal part of the LS (DLS) with the preferential 5-HT<sub>2A</sub> agonist DOI, with the 5-HT<sub>2C</sub> selective agonist MK-212 or with the preferential 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist ketanserin and 10 min later submitted to the model, for measurements of inhibitory avoidance and escape responses. We also investigated whether local pre-administration of ketanserin counteracted the behavioral effects of DOI. At last, in order to assess the effect of the drugs on locomotion, all animals were also tested in an open field immediately after being exposed to the ETM.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (250–300 g) were housed in groups of 4–6 per cage (50 cm × 60 cm × 22 cm) until surgery. After surgery, animals were housed in pairs (cages measuring 30 cm × 19 cm × 13 cm). Room temperature was maintained at 22 ± 1 °C with lights on from 07:00 to 19:00 h. Food and water were freely available throughout the experiments. All procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals, which are also in compliance with international laws and policies. All efforts were made to minimize animal suffering.

### 2.2. Apparatus

#### 2.2.1. Elevated T-Maze

The ETM was made of wood and had three arms of equal dimensions (50 cm × 12 cm). One arm, enclosed by walls of 40 cm high, was perpendicular to two opposed open arms. To avoid falls, the open arms were surrounded by a 1 cm high Plexiglas rim. The whole apparatus was elevated 50 cm above the floor.

#### 2.2.2. Open field

The apparatus used to measure locomotion was a round arena (60 cm × 60 cm), with the floor divided into 16 parts, and walls 50 cm high.

Luminosity at the level of the maze arms or the open field center was 60 lux. After each experimental session, the models were cleaned with a 10% ethanol solution.

### 2.3. Drugs

DOI (2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane) and MK-212 (6-chloro-2-(1-piperazinyl) pirazine) (Sigma, USA) were dissolved in sterile saline 0.9%. Ketanserin (Sigma, USA) was dissolved in a saline-Tween 80 2% solution. Control animals were administered with either saline or saline-Tween 80 2% solution.

### 2.4. Surgery

Rats were anaesthetized with an IP injection of ketamine hydrochloride (80 mg/kg; Agribands, Brazil) and xylazine (10 mg/kg; Agribands, Brazil) and fixed to a stereotaxic frame (Insight, Brazil). Before the implant of stainless steel guide cannulae into the DLS local anaesthesia was also performed (2% lidocaine with a vasoconstrictor; Harvey, Brazil). Guide cannulae were made in our laboratory, from stainless steel (0.6 mm outer diameter, 0.4 mm inner diameter), and were implanted 2 mm above the DLS, to minimize damage to the injection site. The following coordinates from Bregma were used: posterior: +0.5 mm, lateral: +1.9 mm, ventral: −3.3 mm. The guide cannulae were inserted at an angle of 14° with the sagittal plane and were fixed to the skull with acrylic resin and two stainless steel screws. At the end of surgery, cannulae were sealed with stainless steel wires to protect them from obstruction. To prevent infections, at the end of the surgery, all animals were injected (IM) with a 0.2 ml of pentabiotic preparation (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte; Forte Dodge, Brazil) and with the anti-inflammatory flunixin meglumine (1 ml/kg, SC; Banamine; Fort Dodge, Brazil).

### 2.5. Procedure

On the fourth and fifth days after surgery, the rats were gently handled by the experimenter for 5 min. On the sixth day, they were exposed to one of the open arms of the ETM for 30 min. A wooden barrier mounted on the border of the open arm, between the maze's central area and the arm's proximal end, isolated this arm from the rest of the maze. It has been shown that this pre-exposure procedure shortens escape latencies [42]. Thus, it renders the escape task more sensitive to the effects of antipanic drugs [25,26].

On the seventh day, animals were tested in the ETM and in the open field. For each experiment, independent groups of animals were used.

In experiment 1, animals were injected into the DLS (0.2 µl) with DOI (8 or 16 nmol), MK-212 (0.1 or 1.0 nmol) or saline ( $n = 7–13$ ).

In experiment 2, animals were microinjected (0.2 µl) with ketanserin (10 or 20 nmol) or vehicle ( $n = 6–11$ ).

In experiment 3, rats were injected (0.2 µl) into the DLS with ketanserin (10 nmol) or vehicle. Ten minutes later, animals of each group were injected into the DLS either with DOI (8 nmol,  $n = 6–10$ ) or saline. Thus, the following groups were formed: vehicle/saline, vehicle/DOI, ketanserin/saline and ketanserin/DOI. Doses were selected on the basis of previous published studies [41,43,44].

For drug microinjection, a needle (0.3 mm outer diameter) was introduced through the guide cannula until its tip was 2 mm below the end of the cannula. The drugs were injected over a period of 120 s using a 10 µl microsyringe (Hamilton 701-RN, USA) attached to a microinfusion pump (Insight, Brazil). The displacement of an air bubble inside the polyethylene catheter connecting the syringe needle to the intracerebral needle was used to monitor the microinjection. The intracerebral needle was removed 60 s after the injection.

Ten minutes after drug administration, animals were tested in the ETM for inhibitory avoidance measurements. Each rat was placed at the end of the enclosed arm, and the time taken to exit this arm with all four paws was recorded (baseline latency). The same measurement was then repeated in two subsequent trials (avoidance 1 and 2) at 30 s intervals. The time untreated rats remain in the enclosed arm, in a second and third exposure to this arm, usually increases due to these animals' innate fear to height and openness [45]. Following avoidance training (30 s), rats were placed at the end of the same previously experienced open arm and the latency to leave this arm with the four paws was recorded for three consecutive times (escape 1, 2 and 3), again at 30 s intertrial intervals. A cutoff time of 300 s was established for the avoidance and escape latencies.

Immediately after being tested in the ETM, each animal was placed for 5 min in the open field for the evaluation of locomotor activity.

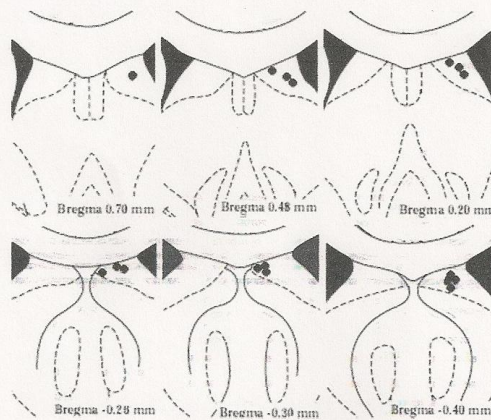
### 2.6. Histology

After the behavioral tests, the animals were anaesthetized with urethane (3 g/kg; Sigma, USA) and injected through the guide cannulae with 0.2 µl of Evans Blue 1% before their brains were perfused, through the left ventricle of the heart, with isotonic saline (0.9%) followed by a 10% formalin solution. The brains were then removed and immersed in a 10% formalin solution for a minimum period of 2 days until frozen sections of 60 µm were obtained on a cryostat. The microinjection sites were localized in diagrams from Paxinos and Watson's rat brain atlas [46]. Only animals with injection sites located inside the DLS were included in the statistical analysis. Anatomical controls (animals with cannulae placement outside the DLS) for the results observed with DOI were included in Fig. 2 ( $n = 5–12$ ).

### 2.7. Statistical analysis

All behavioral data were tested for homogeneity. In case of heterogeneous results, data were subjected to a square root transform and subsequently analyzed. For experiments 1 and 2, two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures was used to analyze avoidance and escape data in the ETM, with treatment as the independent factor and trials (baseline, avoidance 1 and 2, or escape 1–3) as the dependent factor. For experiment 3, a three-factor design was used to analyze



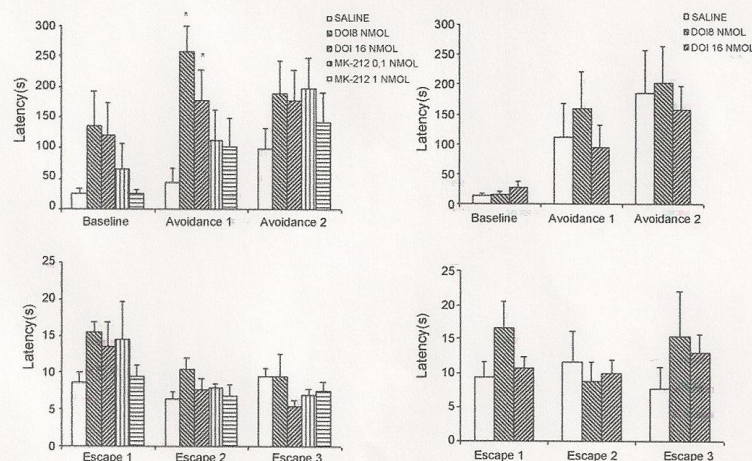


**Fig. 1.** Localization of injection sites inside (dots) in the dorsolateral septum. Figures represent coordinates from Paxinos and Watson [46] rat brain atlas, with respect to Bregma. The number of points in the figure is fewer than the total number of rats used because of several overlaps.

ETM results, with the two treatments (treatment 1: vehicle  $\times$  ketanserin; treatment 2: saline  $\times$  DOI) as the independent factors and trials (baseline, avoidance 1 and 2 or escape 1, 2 and 3 latencies) as the dependent factors. Significant effects of the independent factors or of the interaction between the independent and dependent factors were analyzed by the Duncan *post hoc* test. Locomotor activity in the open field was also analyzed by one-way ANOVA (experiments 1 and 2) or two-way ANOVA (experiment 3) followed by the Duncan *post hoc* test. A value of  $P \leq 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

The diagrams of Fig. 1 show microinjection sites of rats treated intra-DLS with DOI, MK-212, ketanserin and their respective control groups.



**Fig. 2.** Effects (mean  $\pm$  S.E.M.) of intra-dorsolateral septum injection of DOI (8 and 16 nmol/0.2  $\mu$ l), MK-212 (0.1 and 1 nmol/0.2  $\mu$ l) or saline (0.2  $\mu$ l) on inhibitory avoidance (upper panel, left side) and escape (lower panel, left side) latencies measured in the elevated T-maze. The effects of DOI injections outside the dorsolateral septum are represented on the right side of the figure. The latencies to leave the enclosed arm (baseline, avoidance 1 and avoidance 2) or one of the open arms (escape 1–3) were measured at 30 s intervals beginning 10 min after the injections. \* $P < 0.05$  with respect to control in the same trial (ANOVA followed by the Duncan *post hoc* test).  $N = 7–13$ .

#### 3.1. Experiment 1: effects of DOI and MK-212

As shown in Fig. 2 (upper panel, left side), treatment intra-DLS with DOI significantly altered inhibitory avoidance acquisition. MK-212 was without effect. Two-way ANOVA showed a significant effect of treatment [ $F(4,37) = 2.58$ ;  $P < 0.05$ ] and trials [ $F(2,74) = 12.95$ ;  $P < 0.001$ ], but not of treatment by trials interaction [ $F(8,74) = 1.18$ ; NS]. The Duncan *post hoc* test showed that avoidance 1 latencies were significantly ( $P < 0.05$ ) higher in the groups treated with DOI when compared to control animals. Injections of DOI outside the DLS did not alter inhibitory avoidance in the ETM (Fig. 2, upper panel, right side). Two-way ANOVA showed a significant effect of trials [ $F(2,40) = 15.55$ ;  $P < 0.05$ ], but no effect of treatment [ $F(2,20) = 0.28$ ; NS] or treatment by trials interaction [ $F(4,40) = 0.39$ ; NS].

As shown in Fig. 2 (lower panel, left side), treatment with DOI or MK-212 intra-DLS did not interfere with escape behavior. Two-way ANOVA showed a significant effect of trials [ $F(2,74) = 10.38$ ;  $P < 0.001$ ], but not of treatment [ $F(4,37) = 1.34$ ; NS] nor of treatment by trials interaction [ $F(8,74) = 1.67$ ; NS]. In a similar way, injections of DOI outside the DLS did not alter escape measurements in the ETM (Fig. 2, lower panel, right side). Two-way ANOVA did not show a significant effect of treatment [ $F(2,20) = 0.55$ ; NS], trials [ $F(2,40) = 0.52$ ; NS] or treatment by trials interaction [ $F(4,40) = 1.09$ ; NS].

One-way ANOVA revealed no significant differences between animals treated with DOI, MK-212 or saline in the open field. Neither the number of crossings [ $F(4,37) = 2.82$ ; NS] nor the number of rearings [ $F(4,37) = 1.88$ ; NS] were altered by drug administration (see Table 1).

#### 3.2. Experiment 2: effects of ketanserin

As with MK-212, ketanserin did not alter avoidance measurements (Fig. 3, upper panel). Two-way ANOVA revealed a significant effect of trials [ $F(3,46) = 6.57$ ;  $P < 0.01$ ], but not of treatment [ $F(2,23) = 0.59$ ; NS] or of treatment by trials interaction [ $F(4,46) = 0.23$ ; NS].



**Table 1**  
Locomotor activity in the open field after drug injection into the dorsolateral septum.

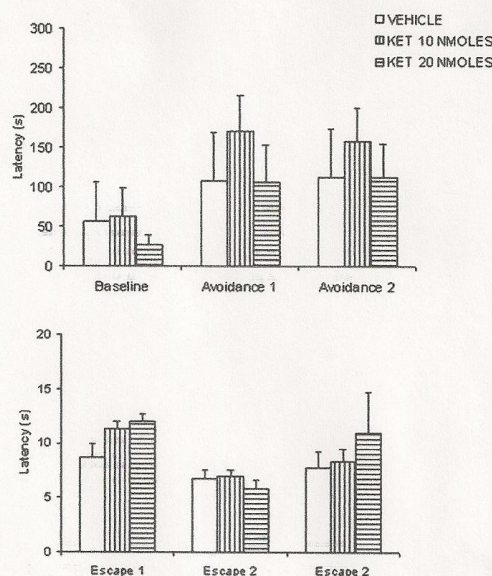
Drugs (nmol)	Number	
	Crossings	Rearings
Saline	77.00 ± 8.16	16.53 ± 1.97
DOI (8)	51.42 ± 9.50	12.14 ± 2.86
DOI (16)	68.75 ± 6.71	13.00 ± 1.31
MK-212 (0.1)	64.00 ± 6.47	17.86 ± 2.19
MK-212 (1)	82.42 ± 8.71	20.85 ± 2.40
Vehicle	79.16 ± 12.0	15.50 ± 4.51
Ketanserin (10)	63.36 ± 5.02	14.64 ± 1.74
Ketanserin (20)	59.78 ± 4.48	14.77 ± 1.23
Vehicle/saline	58.13 ± 6.53	15.63 ± 2.99
Vehicle/DOI (8)	50.86 ± 7.89	12.28 ± 2.06
Ketanserin (10)/saline	59.00 ± 7.54	13.83 ± 2.36
Ketanserin (10)/DOI (8)	78.00 ± 11.23	15.67 ± 1.89

Treatment with ketanserin also did not interfere with escape behavior (Fig. 3, lower panel). Two-way ANOVA showed a significant effect of trials [ $F(2,46)=4.57$ ;  $P<0.05$ ], but not of treatment [ $F(2,23)=0.45$ ; NS] or of treatment by trials interaction [ $F(4,46)=0.66$ ; NS].

One-way ANOVA revealed no significant differences between animals treated with ketanserin or vehicle in the open field. Neither the number of crossings [ $F(2,23)=1.97$ ; NS] nor the number of rearings [ $F(2,23)=0.03$ ; NS] were altered by drug administration (see Table 1).

### 3.3. Experiment 3: effects of the combined treatment with ketanserin and DOI

Fig. 4 (upper panel) shows that ketanserin was able to block the facilitatory effect induced by DOI on inhibitory avoidance.

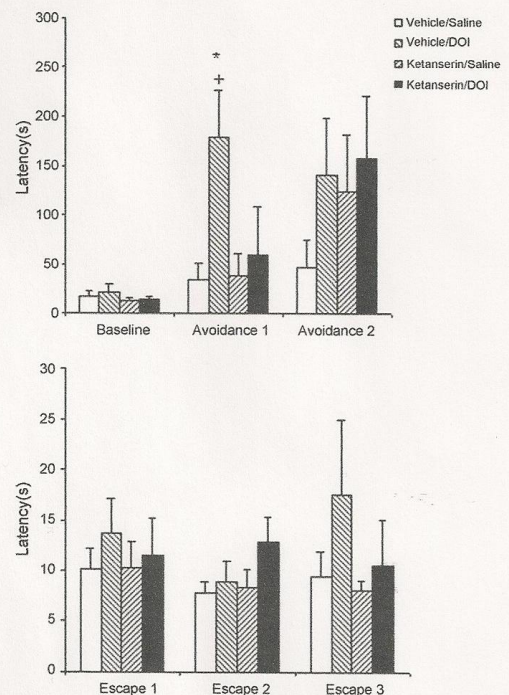


**Fig. 3.** Effects (mean ± S.E.M.) of intra-dorsolateral septum injection of ketanserin (10 and 20 nmol/0.2 µl) or vehicle (0.2 µl) on inhibitory avoidance (upper panel) and escape (lower panel) latencies measured in the elevated T-maze. For further specifications, refer to Fig. 2.  $N=6-11$ .

Three-way ANOVA showed a significant effect of trials [ $F(2,50)=15.24$ ;  $P<0.001$ ] and of trials by DOI interaction [ $F(2,50)=4.35$ ;  $P<0.05$ ], but no effect of trials by ketanserin [ $F(1,50)=1.82$ ; NS], DOI [ $F(1,25)=0.07$ ; NS], ketanserin [ $F(1,25)=1.78$ ; NS], DOI by ketanserin [ $F(1,25)=3.14$ ; NS] or of trials by DOI by ketanserin [ $F(2,50)=1.86$ ; NS]. The Duncan *post hoc* test showed that in avoidance 1 the group treated with vehicle/DOI was significantly different ( $P<0.05$ ) from all the other treatment groups.

Fig. 4 (lower panel) shows that no significant effects were obtained on escape measurements. Three-way ANOVA showed no effects of trials [ $F(2,50)=0.63$ ; NS], DOI [ $F(1,25)=0.19$ ; NS], ketanserin [ $F(1,25)=0.12$ ; NS], DOI by ketanserin [ $F(1,25)=2.29$ ; NS], trials by DOI [ $F(2,50)=1.27$ ; NS], trials by ketanserin [ $F(2,50)=0.66$ ; NS], or trials by DOI by ketanserin [ $F(2,50)=0.29$ ; NS].

Two-way ANOVA revealed no significant differences between the different treatment groups in the open field. Neither DOI nor ketanserin altered the number of crossings or rearings (DOI: crossings: [ $F(1,25)=3.25$ ; NS]; rearings: [ $F(1,25)=0.11$ ; NS]; ketanserin: crossings: [ $F(1,25)=2.85$ ; NS]; rearings: [ $F(1,25)=0.57$ ; NS]) and there was no significant interaction between the two treatments [ $F(1,25)=0.57$ ; NS].



**Fig. 4.** Effects (mean ± S.E.M.) of intra-dorsolateral septum injection of ketanserin (10 nmol/0.2 µl) or vehicle (0.2 µl) previous to the administration of either saline (0.2 µl) or DOI (8 nmol/0.2 µl) on inhibitory avoidance (upper panel) and escape (lower panel) latencies measured in the elevated T-maze. \* $P<0.05$  with respect to control in the same trial; \* $P<0.05$  with respect to all the other groups in the same trial (ANOVA followed by the Duncan *post hoc* test).  $N=6-10$ .



#### 4. Discussion

The purpose of the present study was to investigate the role of 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors of the LS in the regulation of defensive responses generated in the ETM, an animal model of anxiety which allows the measurement of two defensive-related responses in the same animal, inhibitory avoidance and escape [23–26].

Our results showed that intra-DLS administration of the preferential 5-HT<sub>2A</sub> agonist DOI increased inhibitory avoidance latencies, an anxiogenic effect, without altering escape performance. The absence of effects of DOI in ETM escape cannot be related to the fact that the drug was no longer biologically active when this response was measured, since previous studies, performed with DOI administration into other brain structures, have shown effects of the drug in the escape task even when animals were tested 20 min after drug infusion [47,43]. The present results also showed that intra-DLS administration of the selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist MK-212 or of the preferential 5-HT<sub>2A</sub> antagonist ketanserin did not alter ETM avoidance or escape measurements, although the last drug was capable of counteracting the effects induced by DOI. Since no significant effects were observed with any of the drugs tested in the open field, it is reasonable to affirm that the results obtained in the ETM are not due to motor alterations.

The anxiogenic results observed with DOI are very similar to the ones previously obtained with the bilateral intra-LS administration of the 5-HT<sub>1A/7</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT [7]. As DOI, 8-OH-DPAT administered into the LS facilitated the acquisition of inhibitory avoidance in the ETM, without altering escape. Thus, our present results extend previous observations [7] and suggest that not only the activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, but also the activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the LS modulates a specific subtype of defensive response, which involves behavioral inhibition. In fact, the septum (including its lateral and medial aspects) and the hippocampus have been considered as the core structures of the so-called “Behavioral Inhibition System” [1,30,31]. According to Gray and McNaughton [1,30], this system is activated when the animal is faced with a threat, which involves approach behavior (e.g. search for food in an area previously visited by a predator). This behavior is characterized by inhibition of prepotent responses, risk assessment, and increased arousal/vigilance. In approach-avoidance conflict situations, risk assessment functions to reduce the level of perceived threat, while behavioral inhibition reduces risk, in cases of real threat. Based on results that suggest that these manifestations respond to anxiolytic drugs, i.e. diazepam and buspirone, they have been associated to generalized anxiety disorder [30,31].

Corroborating our present results, a previous study performed by Massé et al. [38] has shown that the administration of DOI into the amygdala or into the periaqueductal gray matter – structures as the LS implicated with defense – exerts anxiogenic effects in the four plates test, a model of anxiety in the mouse. Administration of DOI into the hippocampus, on the other hand, showed anxiolytic results [38]. A similar observation was performed in the ETM avoidance task when DOI was administered into the ventromedial hypothalamus [48]. The authors discuss these last apparently contradicting results as possibly related to a GABAergic mechanism, since GABA antagonists block the anxiolytic effects of DOI [49]. This hypothesis is also supported by studies that have shown: (1) inhibition of GABAergic neurotransmission in response to 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockage [50], and (2) co-localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in populations of GABAergic cells [51].

In this sense it is important to emphasize that a significant population of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the septum region is localized in GABAergic interneurons [52]. This would also explain why the activation of both 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the LS resulted in the same behavioral effect, even though stimulation of these

receptors induce opposite cellular effects. While activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors increases the membrane's permeability to potassium [53], activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors induces depolarization, in this case of GABAergic interneurons, by increasing intracellular levels of calcium [54]. Since GABAergic septal neurons project to inhibitory GABAergic interneurons in the hippocampus formation [55], which inhibit the activity of pyramidal neurons, at least theoretically the activation of GABAergic interneurons in the LS could increase the disinhibition of hippocampal pyramidal neurons [52], thus augmenting septum–hippocampus mediated anxiety-related responses (i.e., behavioral inhibition).

Unlike DOI, the more selective 5-HT<sub>2C</sub> agonist MK-212, at least in the range of doses administered, did not significantly alter ETM behavior. Previous reports from the literature have shown controversial effects of 5-HT<sub>2C</sub> agonists in animal models of fear/anxiety [56–58]. For instance, while MK-212 administration into the periaqueductal gray, basolateral amygdala and ventral hippocampus, in the same range of doses used in the present study, exerts anxiogenic effects [41,57,59], no significant results were obtained when the same drug was administered into the dorsal hippocampus [57]. Also, direct administration of mCPP, a non-selective 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist, into the hippocampus decreased the time of social interaction in rats, what is indicative of an anxiogenic-like activity [56]. On the other hand, in mice exposed to the elevated plus-maze mCPP failed to modify behavior when administered into the dorsal or ventral hippocampus [58]. These results draw attention to the complex mechanisms by which serotonin regulates defensive responses and reinforce the idea that different pathways and receptor subtypes are involved in the control of distinct types of behavioral responses and anxiety disorders [32,38–41,59].

As with MK-212, the doses of ketanserin used in the present study did not significantly affect ETM behavior. Corroborating our results, previous studies performed with ketanserin administration into the periaqueductal gray matter or into the ventromedial hypothalamus have also shown absence of effects of the drug in the avoidance or escape tasks of the ETM [43,47,48]. This seems to indicate that, under physiological conditions, activation of serotonergic receptors in these brain regions is not required for the expression of ETM defensive responses; in other words, 5-HT exerts a phasic and not a tonic influence on defensive behaviors [43,47,48].

In conclusion, our data suggest that 5-HT<sub>2A</sub>, but not 5-HT<sub>2C</sub> receptors, in the DLS are involved in the control of inhibitory avoidance behavior and that a failure in this regulatory mechanism may be of importance to the physiopathology of generalized anxiety disorder.

#### Acknowledgements

This work was supported by CNPq and FAPESP (grant number: 08/58815-1), Brazil. The authors thank José Simões Andrade for his helpful technical support.

#### References

- [1] Gray JA. The neuropsychology of anxiety. Oxford: Oxford University Press; 1987.
- [2] Thomas E, Yadin E, Strickland CE. Septal unit activity during classical conditioning: a regional comparison. *Brain Res* 1991;547:303–8.
- [3] Thomas E, Strickland CE, Yadin E, Burock DA. Effects of chlordiazepoxide on single-unit activity in the septal region of the freely moving rat: aversive vs. non-aversive contexts. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;80:151–9.
- [4] Yadin E, Thomas E, Grishkat HL, Strickland CE. The role of the lateral septum in anxiety. *Physiol Behav* 1993;53:1077–83.
- [5] Menard J, Treit D. Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. *Physiol Behav* 1996;60:845–53.
- [6] Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Rev* 2004;46:71–117.



- [7] Viana MB, Zangrossi Jr H, Onusic GM. 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the lateral septum regulate inhibitory avoidance but not escape behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;89:360–6.
- [8] Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 1993;56:115–8.
- [9] Silveira MC, Sandner G, Di Scala G, Graeff FG. *c-fos* Immunoreactivity in the brain following electrical or chemical stimulation of the medial hypothalamus of freely moving rats. *Brain Res* 1995;674:265–74.
- [10] Senba E, Matsunaga K, Tohyama M, Noguchi K. Stress-induced *c-fos* expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. *Brain Res Bull* 1993;31:329–44.
- [11] Sheehan TP, Cirrito J, Numan MJ, Numan M. Using *c-fos* immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 2000;114:337–52.
- [12] Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* 2001;104:1085–97.
- [13] Mongeau R, Miller GA, Chiang E, Anderson DJ. Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *J Neurosci* 2003;23:3855–68.
- [14] Salome AN, Salchner P, Viltart O, Sequeira H, Wigger A, Landgraf R, et al. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry* 2004;55:715–23.
- [15] Beekman M, Flachskamm C, Linthorst AC. Effects of exposure to a predator on behaviour and serotonergic neurotransmission in different brain regions of C57b1/6N mice. *Eur J Neurosci* 2005;21:2825–36.
- [16] Boorse GC, Denver RJ. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Gen Comp Endocrinol* 2006;146:9–18.
- [17] Price ML, Lucki I. Regulation of serotonin release in the lateral septum and striatum by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci* 2001;21:2833–41.
- [18] Cheeta S, Kenny PJ, File SE. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000;24:1053–67.
- [19] Cheeta S, Kenny PJ, File SE. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in mediating the anxiogenic effects of nicotine following lateral septal administration. *Eur J Neurosci* 2000;12:3797–802.
- [20] Handley SL, McBlane JW, Critchley MA, Njung'e K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. *Behav Brain Res* 1993;58:203–10.
- [21] McNaughton N, Zangrossi Jr H. Theoretical approaches to the modeling of anxiety in animals. In: Blanchard RJ, Blanchard DC, Griebel G, Nutt D, editors. *Handbook of anxiety and fear*. Oxford: Elsevier Academic Press; 2008. p. 11–27.
- [22] Graeff FG, Zangrossi Jr H. Animal models of anxiety. In: D'Haenen D, Den Boer JA, Willner P, editors. *Biological psychiatry*. London: John Wiley & Sons; 2002. p. 879–93.
- [23] Graeff FG, Viana MB, Tomaz CAB. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 1993;26:67–70.
- [24] Viana MB, Tomaz CAB, Graeff FG. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:549–54.
- [25] Teixeira RC, Zangrossi H, Graeff FG. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;65:571–6.
- [26] Poltronieri SC, Zangrossi Jr H, Viana MB. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2003;147:185–92.
- [27] Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:205–18.
- [28] Mongeau R, Marsden CA. Effect of imipramine treatments on the 5-HT<sub>1A</sub>-receptor-mediated inhibition of panic-like behaviours in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;131:321–8.
- [29] Jenck F, Moreau JL, Martin JR. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 1995;57:181–91.
- [30] Gray JA, McNaughton N. *The neuropsychology of anxiety*. Oxford: Oxford University Press; 2001.
- [31] McNaughton N, Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:285–305.
- [32] Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:239–59.
- [33] Brandão ML, Zanoveli JM, Ruiz-Martinez RC, Oliveira LC, Landeira-Fernandez J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. *Behav Brain Res* 2008;188:1–13.
- [34] Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Mol Brain Res* 1994;23:163–78.
- [35] Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM, Jennes L. Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol* 1995;351:357–73.
- [36] Leysen JE. 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004;3:11–26.
- [37] Córnea-Herbert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* 1999;409:187–209.
- [38] Massé F, Petit-Demoulière B, Dubois I, Hascoët M, Bourin M. Anxiolytic-like effects of DOI microinjections into the hippocampus (but not the amygdala nor the PAG) in the mice four plates test. *Behav Brain Res* 2008;188:291–7.
- [39] Petit-Demoulière B, Massé F, Cogrel N, Hascoët M, Bourin M. Brain structures implicated in the four-plate test in naïve and experienced Swiss mice using injection of diazepam and the 5-HT<sub>2A</sub> agonist DOI. *Behav Brain Res* 2009;204:200–5.
- [40] Graeff FG, Zangrossi Jr H. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010;10:207–17.
- [41] Yamashita P, Bortoli V, Zangrossi Jr H. 5-HT<sub>2C</sub> receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 2011;60:216–22.
- [42] Sena LM, Bueno C, Pobbe RL, Andrade TG, Zangrossi Jr H, Viana MB. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res* 2003;142:125–33.
- [43] De Paula Soares V, Zangrossi Jr H. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Res Bull* 2004;64:181–8.
- [44] De Paula Soares V, Zangrossi Jr H. Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. *Behav Brain Res* 2009;197:178–85.
- [45] Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;44:463–9.
- [46] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1998.
- [47] Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi Jr H. Chronic imipramine treatment sensitizes 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray matter: evidence from the elevated T-maze test of anxiety. *Behav Pharmacol* 2005;16:543–52.
- [48] Silva ES, Poltronieri SC, Nascimento JO, Zangrossi Jr H, Viana MB. Facilitation of 5-HT<sub>2A/2C</sub>-mediated neurotransmission in the ventromedial hypothalamic nucleus decreases anxiety in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2011;216:692–8.
- [49] Massé F, Hascoët M, Bourin M. Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist) in the four-plate test. *Eur Neuropsychopharmacology* 2007;17:483–91.
- [50] Cozzi VN, Nichols DE. 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists inhibit potassium stimulated-aminobutyric acid release in rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1996;309:25–31.
- [51] Griffiths JL, Lovick IA. Co-localization of 5-HT<sub>2A</sub>-receptor- and GABA immunoreactivity in neurones in the periaqueductal grey matter of the rat. *Neurosci Lett* 2002;326:151–4.
- [52] Lüttgen M, Ögren OS, Meister B. Chemical identity of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactive neurons of the rat septal complex and dorsal hippocampus. *Brain Res* 2004;1010:156–65.
- [53] Aghajanian GK. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: Bloom FR, Kupfer DJ, editors. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. New York: Raven; 1995. p. 1451–9.
- [54] Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;71:533–54.
- [55] Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 1988;336:170–3.
- [56] Whitton P, Curzon G. Anxiogenic-like effect of infusing 1-(3-chlorophenyl) piperazine (mCPP) into the hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;100:138–40.
- [57] Alves SH, Pinheiro G, Motta V, Landeira-Fernandez J, Cruz AP. Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT<sub>2C</sub> agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol* 2004;15:37–43.
- [58] Cornélio AM, Nunes-de-Souza RL. Anxiogenic-like effects of mCPP microinjections into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 2007;178:82–9.
- [59] Vicente MA, Zangrossi Jr H. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14:1–12.